

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II



FACOLTA' DI AGRARIA

Dipartimento di Arboricoltura Botanica e Patologia Vegetale

**CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN AGROBIOLOGIA ED AGROCHIMICA
INDIRIZZO PATOLOGIA VEGETALE
XXII CICLO**

**TRASFERIMENTO ORIZZONTALE DEL GENE *NPTII* DA PIANTE
TRANSGENICHE A BATTERI FITOPATOGENI**

TUTOR

Prof. Astolfo Zoina

CANDIDATO

Dott.ssa Lucia Cozzolino

COORDINATORE DEL DOTTORATO

Prof. Matteo Lorito

Triennio 2007-2009

INDICE

I

1. INTRODUZIONE	4
1.1 Piante geneticamente modificate e loro diffusione	4
1.2 Possibili rischi associati alla coltivazione e all'utilizzo di piante transgeniche	6
1.3 Il trasferimento genico orizzontale	13
1.4 I tre batteri patogeni del pomodoro utilizzati	17
1.5 scopo della tesi	24

2

2. MATERIALI E METODI	26
2.1 Materiale Vegetale	26
2.2 Ceppi batterici e plasmidi	26
2.3 Substrati, soluzioni e condizioni di crescita	28
2.4 Caratterizzazione dei ceppi batterici utilizzati	29
2.5 Prove di patogenicità	31
2.6 Isolamento e conte microbiche	31
2.7 Estrazione di DNA plasmidico	32
2.8 Estrazione di DNA genomico	35
2.9 Reazioni di amplificazione	37
2.10 Manipolazione del DNA	41
2.11 Verifica del trasferimento genico orizzontale mediante trasformazione naturale	49
2.12 Trasformazione in vivo di <i>Pseudomonas corrugata</i> con DNA di pomodoro transgenico	53
2.13 Test del Twitching motility	54

3

3. RISULTATI	55
3.1 Caratterizzazione degli isolati batterici	55
3.2 Prove di patogenicità	57
3.3 Ottenimento dei batteri fitopatogeni “accettori” pLafΔnptII	60
3.4 Identificazione della sequenza <i>nptII</i> nel DNA delle piante transgeniche	63
3.5 Trasformazione in vitro dei ceppi batterici accettori	63

3.6 Trasformazione naturale di <i>Pseudomonas corrugata</i>	67
3.7 Trasformazione in vivo di <i>P. corrugata</i> inoculata in piante di pomodoro transgenico	77
3.8 verifica della presenza del gene <i>pilT</i> mediante PCR in <i>P. corrugata</i> e Test del Twitching motility	78

4

4. DISCUSSIONE	81
-----------------------	-----------

5

5. BIBLIOGRAFIA	87
------------------------	-----------

1. INTRODUZIONE

1.1 PIANTE GENETICAMENTE MODIFICATE E LORO DIFFUSIONE

Gli organismi portatori di uno o più geni eterologhi non naturalmente presenti nel loro genoma, oppure recanti mutazioni indotte rispetto ai geni *wild-type*, vengono definiti geneticamente modificati o più semplicemente, transgenici. I geni eterologhi possono appartenere ad un organismo diverso oppure essere costruiti chimerici comprendenti parti di geni diversi. L'espressione di tali geni è regolata da promotori dell'organismo ospite o da promotori anch'essi eterologhi.

Quanto detto applicato al regno vegetale porta alla produzione di piante geneticamente modificate (PGM). Attualmente il numero di piante geneticamente modificate utilizzate in agricoltura supera abbondantemente la dozzina di specie e tra esse non presenziano più solo le *major crops*, coltivate estensivamente su tutto il pianeta, ma anche specie ornamentali come la petunia e il garofano e specie che crescono solo in determinate regioni del pianeta (mango, banana, papaya) e legate a specifiche tradizioni culturali. [Clive 2008] Comunque se si osserva la diffusione commerciale di piante transgeniche, si nota che il 99% di esse è rappresentato da sole quattro specie: Soia, Mais, Cotone e Colza modificate per ottenere la tolleranza agli erbicidi (principalmente al glyphosate o al glufosinato, cosiddetti erbicidi ad ampio spettro) o la resistenza ad alcuni insetti (ad esempio la piralide o la diabrotica per il mais). Fig.1.1-1.2

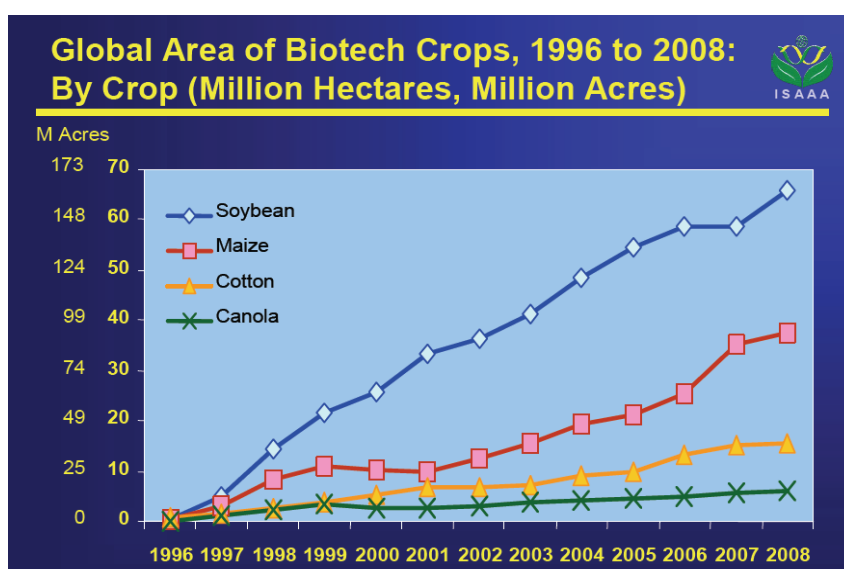


Fig.1.1 Superficie mondiale coltivata con le *major crops* GM

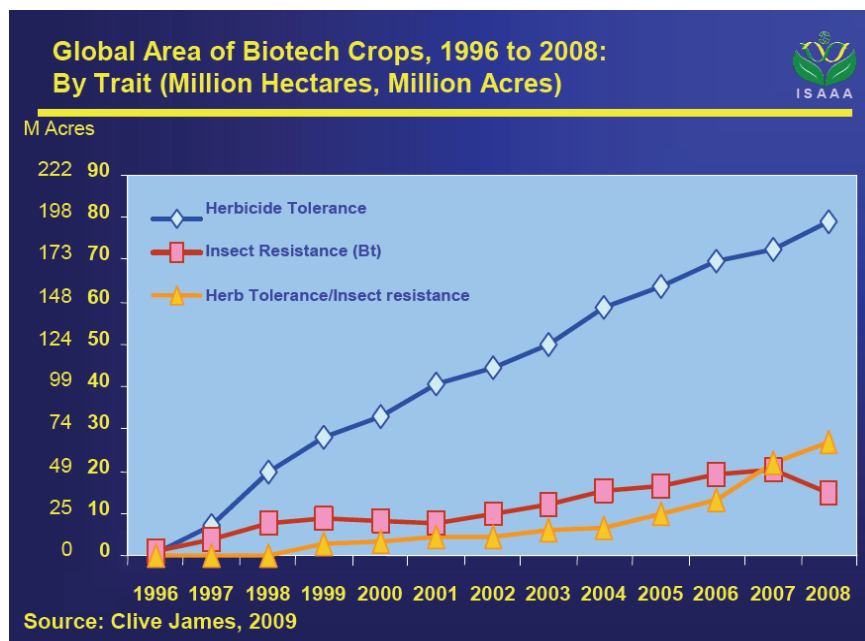


Fig.1.2 Principali caratteri introdotti nelle *major crops* GM

Secondo i dati diffusi dall'ISAAA (International Service for the Acquisition of Agri-biotechnology Applications) nel 2008, la superficie mondiale coltivata con piante transgeniche superava i 125 milioni di ettari, rispetto ai 114,3 milioni di ettari del 2007, e il trend sembra essere in continua crescita con un incremento annuo di circa 10 milioni di ettari. I paesi dove si coltivano maggiormente piante transgeniche sono: Stati Uniti, Argentina, Canada, Brasile e Cina. In Europa vi sono piccole coltivazioni in Germania e Francia, mentre la Spagna e alcune nazioni dell'Europa orientale già da diversi anni coltivano alcune decine di migliaia di ettari con piante transgeniche. In totale, il numero di paesi in cui si coltivano PGM è passato dai 22 del 2007 ai 25 del 2008 in seguito all'aggiunta di due paesi africani (Egitto e Burkina Faso) e della Bolivia. Questi 25 paesi rappresentano il 55% della popolazione mondiale e il 52% della terra arabile del mondo . (Fig. 1.3) [www.isaa.org].

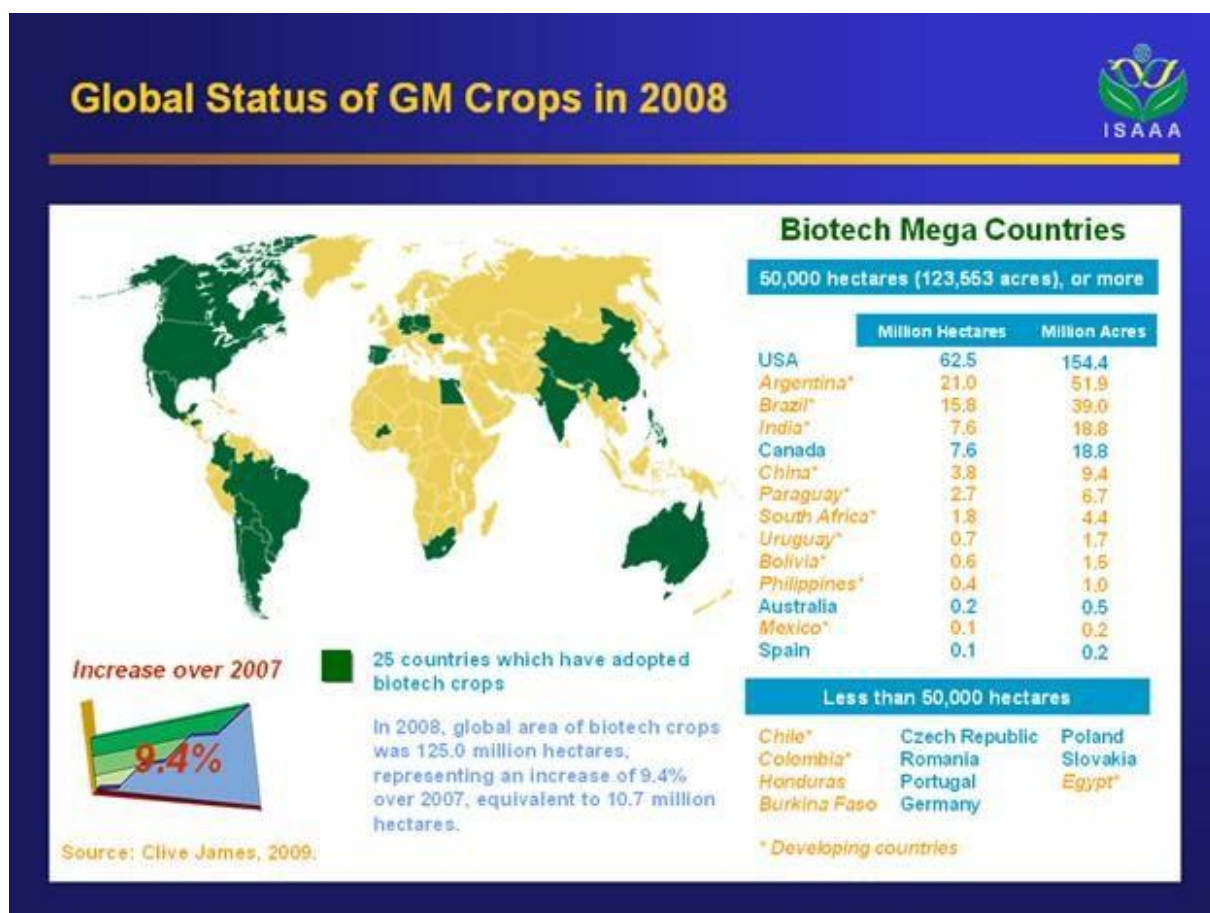


Fig.1.3 Diffusione delle coltivazioni transgeniche nel mondo

1.2 POSSIBILI RISCHI ASSOCIATI ALLA COLTIVAZIONE E ALL'UTILIZZO DI PIANTE TRANSGENICHE

Molti ritengono che le conseguenze sulla salute umana e sugli ecosistemi, a seguito dell'introduzione nell'ambiente di piante transgeniche, siano del tutto imprevedibili e che per quanto raffinate e restrittive siano le norme autorizzative per gli OGM esse non saranno mai in grado di misurare in modo esaustivo e di escludere la presenza di rischi legati all'adozione di un nuovo OGM. Oggi esiste un quadro normativo che identifica delle norme precise per garantire il controllo e la gestione dei possibili rischi legati alla diffusione delle piante transgeniche, primo tra tutti il Protocollo di Cartagena sulla Biosicurezza, nato per assicurare la protezione contro i possibili effetti negativi sulla biodiversità, oltre che le leggi nazionali e comunitarie. [www.cbd.int]

Di seguito sono descritti alcuni dei potenziali rischi che vengono attribuiti alle piante transgeniche e alla loro coltivazione e utilizzazione su larga scala.

REAZIONI ALLERGICHE

Uno dei rischi potenziali legato alla modificazione genetica delle piante ad uso alimentare è che l'inserito genico porti alla produzione di proteine non normalmente presenti nella pianta stessa e che potrebbero causare reazioni allergiche in soggetti predisposti. Questo evento è già avvenuto nella storia degli OGM infatti agli inizi degli anni '90 si cercò di rendere la soia più nutriente inserendo nel suo genoma un gene che codificava una proteina della noce brasiliana, con l'intento di aumentare il contenuto in metionina e cisteina, due amminoacidi di cui la soia è povera. La modificazione genetica aveva però trasferito nella soia anche i geni che codificano per l'albumina 2S, il principale allergene della noce. [Nordlee *et al.* 1996]

Poiché questo tipo di problema potrebbe presentarsi anche in altre varietà, l'analisi di tale potenziale rischio è per legge obbligatorio sia nelle fasi di sviluppo dei nuovi OGM che nelle procedure di autorizzazione. Oggi infatti, grazie alle conoscenze acquisite dall'allergologia, è in parte possibile prevedere se una nuova proteina può avere o meno un potenziale allergenico. Inoltre è previsto un piano di monitoraggio post-autorizzazione che consenta in ogni caso di verificare la bontà della valutazione e, qualora emergessero problematiche, di ritirare il prodotto per ulteriori verifiche. Va comunque ricordato che non tutti gli OGM contengono nuove proteine, a volte si differenziano per la mancanza di una proteina presente invece nel corrispettivo convenzionale; è questo il caso del pomodoro a maturazione rallentata, in cui un enzima coinvolto nella maturazione nel pomodoro tradizionale viene eliminato tramite una modificazione genetica.

Paradossalmente le piante GM possono addirittura essere progettate per ridurre il potenziale allergenico degli alimenti. Questo tentativo è stato fatto ed è stato coronato da successo in Giappone. Qui alcuni ricercatori sono riusciti a ridurre del 70-80% i livelli di una proteina allergenica presente nel riso inserendo un gene antisense che ne blocca la produzione, sconfiggendo quindi una delle allergie alimentari più diffuse fra i giapponesi.

DIMINUZIONE DELLA BIODIVERSITÀ

In generale con il termine “biodiversità” si intende l’insieme di tutte le forme viventi, geneticamente dissimili e degli ecosistemi ad esse correlati. Si possono distinguere almeno tre tipi di biodiversità in relazione ad altrettanti livelli di organizzazione biologica:

- intraspecifica: costituita dal numero di varietà, razze e genotipi diversi, appartenenti alla stessa specie animale o vegetale
- interspecifica: definita sostanzialmente dal numero complessivo di specie diverse
- ecosistemica: data dalla straordinaria varietà di sistemi ecologici esistenti sulla terra

Le attività antropiche, distruggendo interi paesaggi naturali, ecosistemi ed habitat particolari, stanno causando un rapido declino della biodiversità portando all’estinzione di un grande numero di specie.

È un processo irreversibile il cui incalcolabile danno non potrà più essere riparato. La biodiversità in generale è molto importante poiché garantisce le capacità di adattamento e la persistenza dei biosistemi contro le mutevoli condizioni ambientali. Costituisce inoltre un prezioso serbatoio di geni da cui attingere per migliorare le specie d’interesse agroalimentare, selvicolturale, zootecnico e industriale. La biodiversità è inoltre fondamentale per far fronte ad eventuali stress abiotici molto intensi o allo sviluppo di agenti patogeni particolarmente aggressivi che in alcuni casi hanno portato al collasso interi sistemi agrari, causando gravi danni economici e sociali.

Lo sviluppo delle colture transgeniche potrebbe avere un effetto negativo sulla biodiversità delle piante coltivate e/o delle piante spontanee. Già la diffusione delle monocolture in agricoltura ha ridotto considerevolmente il numero di varietà coltivate che negli ultimi 50 anni è passato da 500 a circa 200; ma il numero delle cultivar di piante utilizzate per la produzione di linee transgeniche è ancora minore di quello delle varietà attualmente coltivate. In questo senso l’introduzione di PGM in agricoltura potrebbe ridurre ulteriormente il numero di varietà utilizzate con il rischio di perdere estesi raccolti nel caso la varietà utilizzata si dimostrasse inefficiente nell’affrontare una avversità non prevista.

Il rischio comunque che le specie transgeniche si comportino come specie invasive, che si affermano cioè nell’ecosistema a danno di altre specie e varietà, è comunque considerato dai biologi dell’IUCN (International Union for the Conservation of Nature and Natural Resources), come marginale rispetto all’impatto che l’agricoltura e l’urbanizzazione in se stesse hanno sulla biodiversità.[www.conservationmeasures.org].

Anche la composizione della microflora e microfauna associata alle piante transgeniche potrebbe essere in pericolo; infatti sia la composizione della microflora associata alla

rizosfera, sia le interazioni pianta-microrganismi risultano direttamente dipendenti dagli essudati prodotti dalla particolare specie e/o varietà di pianta e potrebbero perciò essere stravolte dall'introduzione di linee transgeniche [Grayston *et al.* 1998; Bais *et al.* 1998].

INQUINAMENTO GENETICO: DIFFUSIONE DI TRANSGENI

Negli organismi procarioti il trasferimento dell'informazione genetica avviene normalmente in maniera "verticale", cioè da cellula madre a cellule figlie, tramite la "divisione clonale"; in questo modo da una cellula madre si ottengono due cellule figlie uguali. Tale tipo di trasferimento della informazione genetica implica che tali organismi, per adattarsi ai cambiamenti ambientali ("pressione selettiva"), devono sperare nelle "mutazioni", ovvero cambiamenti casuali del genoma dovuti ad errori nella sua duplicazione e/o a spostamenti di sue porzioni (trasposoni).

Nel corso dell'evoluzione tali organismi hanno messo a punto altri meccanismi che consentono lo scambio di materiale genetico fra individui differenti. La particolarità interessante di tali meccanismi, che li rende per certi versi più avanzati della riproduzione sessuata, è che permettono di effettuare scambi di materiale genetico anche con bassi gradi di omologia arrivando anche allo scambio eterologo, cioè tra specie differenti, cosa assolutamente impossibile attraverso la riproduzione sessuata. Il realizzarsi di tale eventualità è definito come trasferimento orizzontale dell'informazione genetica.

In relazione all'utilizzo di OGM una delle maggiori fonti di preoccupazione riguarda proprio la possibilità di trasferimento di materiale genetico tra specie diverse con possibile diffusione incontrollata di transgeni tra la comunità microbica del suolo. Gli scambi genetici nel suolo dipendono dalle sue caratteristiche fisico-chimiche, dal tipo di pratiche agronomiche (ad esempio se lasciato incolto o soggetto a frequenti lavorazioni), dalla presenza o meno di copertura vegetale, e dalle condizioni climatiche della zona. Tali caratteristiche influenzano l'attività microbica e tutto il complesso delle reazioni biochimiche che avvengono di conseguenza. Uno studio ha evidenziato la possibilità che il DNA si muova velocemente lungo i profili del suolo, sfuggendo alla degradazione, all'aumentare del contenuto idrico di quest'ultimo in presenza di una buona velocità di percolazione dell'acqua. In questo modo la molecola del DNA "biologicamente attiva" potrebbe giungere anche a notevoli distanze dal luogo di origine. [Potè *et al.*, 2003]

Sulla base di quanto esposto finora si può quindi intendere per "inquinamento genetico" l'introduzione antropica di geni non presenti in precedenza nell'ambiente considerato. Tale

definizione non è però sufficiente in quanto la semplice presenza nel suolo di geni “estranei” non implica la loro espressione negli eventuali organismi ospiti e neppure il conferimento a questi di significativi vantaggi evolutivisti. Nella definizione di “inquinamento genetico” vanno quindi introdotti i concetti di “espressione” ed “affermazione” che i geni “estranei” devono poter realizzare negli organismi ospiti.

RESISTENZA AGLI ANTIBIOTICI La resistenza dei batteri agli antibiotici è aumentata molto negli ultimi decenni e questo ha determinato una limitazione all’uso di alcuni antibiotici per trattare e controllare molti tipi di malattie batteriche. E’ stato inoltre dimostrato che l’uso intensivo di antibiotici ha alterato la composizione delle comunità microbiche poiché le popolazioni batteriche resistenti acquisiscono un vantaggio selettivo rispetto alle popolazioni sensibili. [Smalla *et al.* 2000]

Gli ambienti naturali, rappresentano una riserva di geni di resistenza agli antibiotici, tali geni sono presenti nei batteri coltivabili che però rappresentano solo una piccolissima parte delle popolazioni batteriche totali presenti; infatti, come dimostrato recentemente utilizzando librerie di DNA estratto da suolo, geni di resistenza agli antibiotici sono presenti anche in moltissime specie non coltivabili. [Riesenfeld *et al.* 2004]. A questo punto è facilmente intuibile come cambiamenti negli ecosistemi, che potrebbero essere causati dall’introduzione di coltivazioni transgeniche, potrebbero avere effetti imprevedibili sullo sviluppo di nuove resistenze agli antibiotici nei microrganismi presenti nell’ambiente. [Martinez 2008; Demanèche *et al.* 2008]

La prima generazione di piante geneticamente modificate è stata ottenuta utilizzando geni di resistenza agli antibiotici. Questi geni nonostante siano utilizzati soprattutto nelle fasi di costruzione di plasmidi e/o vettori necessari per la trasformazione delle piante, in molti casi restano anche nel prodotto finito.

Il gene di resistenza maggiormente utilizzato nelle biotecnologie vegetali è il gene *nptII*, codificante per la neomicina fosfotransferasi II che conferisce resistenza agli antibiotici neomicina, kanamicina e numerosi analoghi aminoglicosidi. Questo antibiotico è utilizzato in medicina per il trattamento di alcune forme di otite, congiuntivite e infezioni della pelle. [Goldstein *et al.* 2005] Molti batteri resistenti all’antibiotico kanamicina sono stati isolati in differenti ambienti naturali: diversi tipi di suolo, rive di fiumi e laghi, acque di depurazione, letame suino, ecc. Nella quasi totalità di questi batteri isolati, la resistenza

alla kanamicina era dovuta al gene *nptII* la cui presenza quindi è molto diffusa in ambienti anche diversissimi. [Smalla *et al.* 1993]

Uno dei principali rischi legati all'utilizzo dei geni di resistenza agli antibiotici riguarda la possibilità che tali geni possano essere trasferiti dalle piante GM a batteri patogeni umani e/o simbionti o batteri associati a piante e suolo. La creazione e la coltivazione estensiva di piante transgeniche contenenti geni di resistenza agli antibiotici determina un incremento della presenza di tali geni nell'ambiente e ciò unito ad una possibile lunga persistenza del DNA transgenico nell'ambiente, potrebbe determinare fenomeni di trasferimento di resistenza agli antibiotici tra batteri e batteri e/o tra pianta e batteri [Bennet *et al.* 2004].

Il suolo è uno degli ambienti naturali maggiormente studiati in riferimento all'impatto delle piante transgeniche sull'ambiente. Il suolo esercita numerose funzioni essenziali per l'ecosistema terrestre fungendo da supporto per la vita vegetale ed animale, per i cicli nutritivi, per la degradazione di qualsiasi sostanza che ad esso giunge, per la depurazione delle acque. Un ruolo di fondamentale importanza per lo svolgimento di queste funzioni è ricoperto dai microrganismi, attraverso azioni di molteplice natura. I microrganismi intervengono infatti nella mineralizzazione della sostanza organica, nella sintesi dell'azoto, nella formazione dell'humus, agiscono sulla mobilitazione degli elementi minerali, e instaurano rapporti di interazione con le piante determinando così la qualità e la fertilità del suolo. I microrganismi rappresentano dunque una componente di fondamentale importanza per la fertilità dei terreni e svolgono un ruolo insostituibile, in mancanza del quale il terreno rappresenterebbe semplicemente un inerte supporto meccanico.

Nel suolo, inoltre, data la presenza di una moltitudine di specie viventi vi è anche una elevata quantità di materiale genetico estremamente differenziato.

Il DNA transgenico è rilasciato nel suolo durante i processi di decomposizione dei tessuti vegetali. E' stato dimostrato che tale DNA può essere adsorbito dalle varie componenti del suolo, essere protetto dall'attacco delle nucleasi microbiche e rimanere, anche per molti mesi, biologicamente attivo per la trasformazione naturale dei microrganismi.

I microrganismi tellurici possono essere esposti ed essere trasformati geneticamente sia durante il processo di decomposizione, sia successivamente, ma risulta molto difficile determinare la frequenza di tali eventi di trasformazione.[Widmer *et al.* 1996]

La persistenza del DNA nel suolo sembra dipendere da fattori biotici e abiotici, in particolare influisce la diversa composizione minerale del suolo. I minerali argillosi risultano particolarmente reattivi nell'adsorbire il DNA: 1 g di argilla, infatti, (montmorillonite) può adsorbire fino a 30 mg di DNA. [Bertolla *et al.* 1999^b]

IMPATTO DELLE COLTURE GM SUI MICRORGANISMI NON-TARGET ASSOCIATI A PIANTE E SUOLO

Le comunità microbiche del suolo sono esposte alle PGM e ai prodotti delle PGM in diversi modi. I microrganismi che ne fanno parte possono essere esposti direttamente alle radici delle PGM, o indirettamente agli essudati delle stesse o ancora ai residui vegetali. I transgeni possono venirsi a trovare sulla superficie del suolo o anche in profondità a seguito delle lavorazioni periodiche cui va incontro un suolo coltivato. (Fig. 1.4) [Dunfield and Germida 2004]

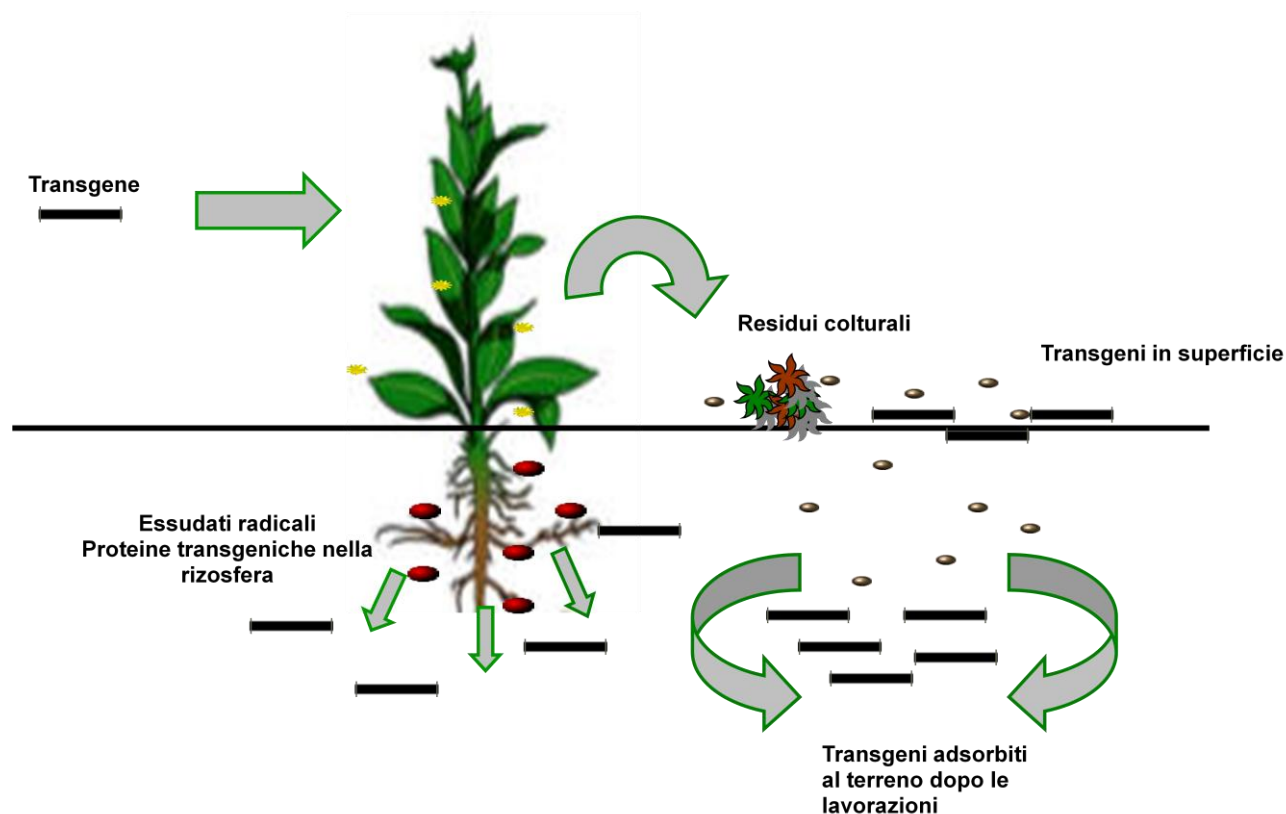


Fig. 1.4 Potenziali siti di interazione fra transgeni e comunità microbiche

Alcune proteine, codificate dai transgeni, possono essere rilasciate nell'ambiente direttamente dalle radici delle piante o attraverso ferite o possono essere presenti negli essudati radicali. E' stato dimostrato il rilascio della tossina Bt dalle radici di mais transgenico (Bt) nella rizosfera, dove mantiene la sua attività insetticida per almeno 33

settimane, in quanto capace di legarsi alle particelle di argilla del suolo dove resta ben protetta dalla degradazione microbica. Questo studio suggerisce possibili effetti di lungo periodo sugli organismi non-target o sulla selezione di insetti target resistenti alla tossina. [Saxena and Stotzky 2000]

La degradazione della proteina Bt nel suolo è attualmente oggetto di numerosi studi volti soprattutto a verificare caso per caso la degradabilità dei residui vegetali di piante GM Bt in suoli ed ambienti pedoclimatici diversi. [Hopkins and Gregorich, 2004]

Comunque il principale settore di studi riguardante gli effetti delle piante transgeniche sui microrganismi ambientali non target riguarda la possibilità di trasferimento genico orizzontale dalle piante transgeniche ai batteri associati a piante e suolo.

1.3 IL TRASFERIMENTO GENICO ORIZZONTALE

La scoperta del trasferimento genico orizzontale risale al 1928 quando lo scienziato Fred Griffith verificò il trasferimento di materiale genetico da ceppi di *Streptococcus pneumoniae* virulenti a ceppi non virulenti della stessa specie mediante un meccanismo che egli chiamò trasformazione. [Keese 2008]. Oggi il meccanismo del trasferimento genico orizzontale (HGT) è stato dimostrato e ben caratterizzato nei batteri per i quali rappresenta un importante meccanismo evolutivo [Lorenz *et al.* 1994]. Per i batteri lo scambio genico orizzontale può avvenire per diverse vie:

- batteri con capacità coniugative possono trasferire a batteri accettori una grande quantità di sequenze; gli elementi necessari alla coniugazione possono trovarsi su plasmidi o su trasposoni ed essere eventualmente integrati nel genoma. In questo caso, durante la coniugazione, vengono trasferite anche sequenze cromosomiche.
- Il processo di trasduzione, mediato da batteriofagi, prevede che un fago il cui genoma si sia integrato nel batterio infettato possa incorporare nel suo cromosoma anche DNA batterico al momento della sua attivazione. In una successiva infezione tale DNA può trasferirsi in maniera stabile ad un altro batterio.
- La trasformazione naturale prevede che batteri competenti siano in grado di acquisire DNA esogeno libero nell'ambiente e di integrarlo stabilmente nel proprio genoma. (Fig.1.5) [Lorenz *et al.* 1994]

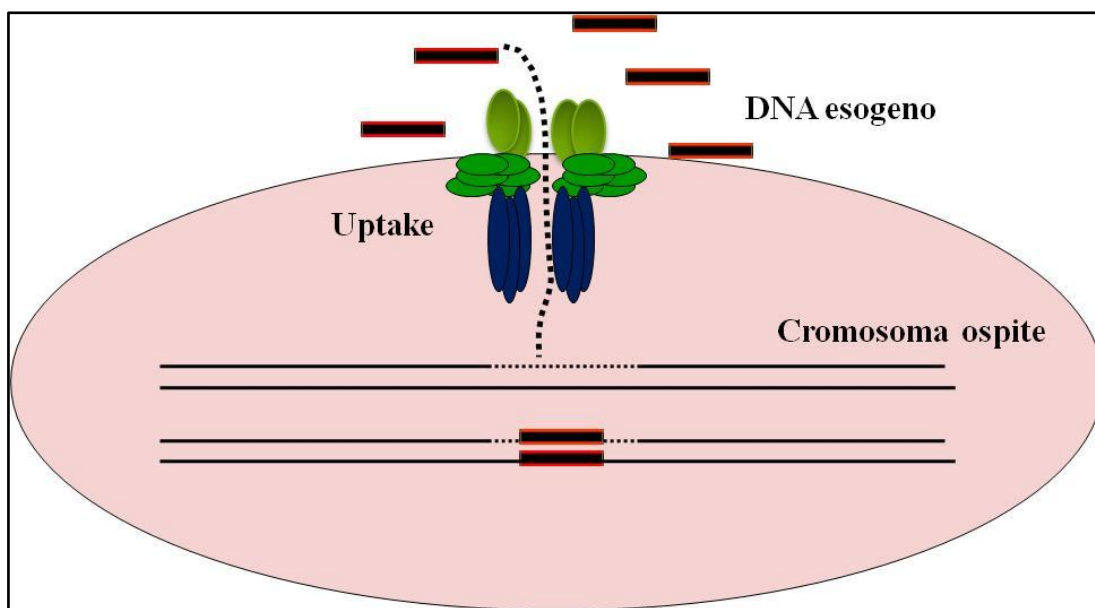


Fig. 1.5 Meccanismo della trasformazione naturale

Il trasferimento genico orizzontale da piante transgeniche a batteri è considerato uno dei principali rischi legati alla coltivazione di piante GM e in realtà ci sono molte opportunità per i batteri di interagire con DNA proveniente da piante GM.

I batteri possono interagire direttamente con la pianta come commensali, simbionti o parassiti; i batteri tellurici possono interagire con i residui vegetali nel terreno. Molti studi hanno dimostrato la persistenza e il trasferimento di DNA transgenico da piante a batteri.[Nielsen *et.al* 1998].

Le specie batteriche maggiormente studiate riguardo il fenomeno dell'HGT da piante transgeniche sono : *Acinetobacter* sp. e *Pseudomonas stutzeri*.

Nielsen *et al.* hanno utilizzato *Acinetobacter* sp. come ceppi “accettori” di DNA da patata e barbabietola contenenti il gene di resistenza alla kanamicina *nptII*. La frequenza di trasformazione massima è stata di 10^2 trasformanti/accettori in condizioni ottimizzate di laboratorio. [Nielsen *et al.* 1997]

In un altro studio Ghebard e Smalla hanno sviluppato una strategia basata sulla costruzione di ceppi batterici accettori che esibivano una sequenza deleta del gene marcatore *nptII*. Questi esperimenti, condotti in condizioni ottimizzate di laboratorio, hanno dimostrato che il DNA estratto da barbabietole GM, contenenti lo stesso gene marcatore del batterio senza però la delezione, poteva trasformare con successo *Acinetobacter calcoaceticus* e ripristinare il gene deletato nei ceppi accettori: Tali batteri, in seguito a ricombinazione

omologa esprimevano la resistenza ed erano in grado di crescere su substrato contenente la kanamicina. In questo caso anche l'omogenato di pianta GM era in grado di trasformare *A. calcoaceticus* con una frequenza pari a 1.5×10^{-5} trasformanti/cellule accettori.

De Vries and Wackernagel hanno dimostrato una frequenza simile di trasformazione utilizzando DNA estratto da varie piante transgeniche (*Solanum tuberosum*, *Nicotiana tabacum*, *Beta vulgaris*, *Brassica napus* e *Solanum lycopersicon*) mentre Iwaki *et al.* hanno dimostrato la trasformazione naturale di *A. calcoaceticus* con DNA estratto da papaya GM. [Ghebard and Smalla, 1998; Iwaki and Arakawa, 2006]

Geni da piante di tabacco GM, con transgeni presenti nel genoma plastidiale, sono stati trasferiti ad un ceppo di *Acinetobacter* sp. contenente un plasmide con una sequenza omologa al genoma plastidiale. In questo caso, anche il DNA non purificato costituito dall'omogenato del tessuto GM, poteva fungere da donatore suggerendo che né la conformazione istonica, né altre proteine vegetali, erano in grado di inibire la trasformazione naturale del batterio. [Kelly *et al.* 2009]

Un altro studio molto interessante ha riguardato il trasferimento genico da piante di pomodoro infettate con il patogeno *R. solanacearum* ad *Acinetobacter* sp.

Acinetobacter sp. non era in grado di colonizzare piante di pomodoro sane: al contrario nelle piante infette la popolazione di *Acinetobacter* sp. raggiungeva una concentrazione di 3.1×10^7 cfu/grammo tessuto e tali livelli di concentrazione erano mantenuti fino alla morte della pianta. In queste condizioni, *Acinetobacter* sp. risultava quindi in grado di sviluppare una naturale competenza nella pianta e di acquisire il DNA vegetale. [Kay *et al.* 2002^a ; Kay *et al.* 2002^b]

Anche *P. stutzeri* è in grado di acquisire DNA esogeno mediante il meccanismo della trasformazione naturale e per tale specie sono anche stati individuati alcuni geni la cui presenza è indispensabile per l'uptake del DNA. In particolare, *P. stutzeri*, possiede il sistema di pili IV la cui presenza è essenziale oltre che per l'uptake del DNA anche per un particolare tipo di movimento flagello-indipendente noto con il nome di twitching motility. E' stato dimostrato che ceppi di *P. stutzeri*, privi del gene *pilT*, non erano più in grado di retrarre i pili che quindi restavano sempre all'esterno della cellula; il blocco dei pili determinava sia l'incapacità dei batteri a muoversi con il meccanismo del twitching, sia l'incapacità ad acquisire DNA esogeno. [Graupner *et al.* 2001]

de Vries *et al.* [2001] hanno dimostrato che *P. stutzeri* era trasformabile da DNA di patata transgenica quando erano presenti sequenze omologhe nella pianta e nel batterio, al

contrario in assenza di omologia di sequenza la probabilità di trasformazione risultava estremamente bassa.

TRASFERIMENTO GENICO ORIZZONTALE DA PIANTE GM A BATTERI FITOPATOGENI

Anche i batteri fitopatogeni potrebbero essere coinvolti nel fenomeno del trasferimento genico orizzontale in virtù del fatto che, durante il processo patogenetico le cellule vegetali vanno incontro a lisi rilasciando il DNA che potrebbe così essere disponibile per essere acquisito da batteri competenti. Molti sono stati gli studi condotti per valutare l'HGT nei batteri tellurici, al contrario poche indagini sono state effettuate sui batteri fitopatogeni

Un primo studio ha riguardato il batterio fitopatogeno *Erwinia chrysanthemi* e la pianta transgenica *Solanum tuberosum*, nel cui genoma è stato inserito il gene per la resistenza all'ampicillina, sotto il controllo di un promotore batterico.

La possibile trasformazione è stata studiata sia in vitro sia che inoculando i batteri direttamente nel tubero della patata transgenica.

E. chrysanthemi secerne enzimi pectinolitici che determinano la lisi dei tessuti con conseguente rilascio del DNA vegetale, tale DNA restava quindi libero di essere acquisito dal ceppo fitopatogeno. Questi approcci non hanno consentito di evidenziare trasformanti per cui è stata calcolata solo una frequenza potenziale di trasformazione pari a 2×10^{-17} senza che sia stata dimostrata l'effettiva competenza alla trasformazione naturale di *E. chrysanthemi*. [Schlüeter et.al 1997]

In un altro studio è stato invece utilizzato *Agrobacterium tumefaciens* come specie batterica accettori in esperimenti di trasformazione con tabacco contenente il gene *accI*, che conferisce resistenza alla gentamicina ma anche in questo caso non sono stati ottenuti trasformanti.[Nielsen et L. 1997]. Successivamente però Demanèche *et al.* [2001] hanno dimostrato che la specie *Agrobacterium tumefaciens* è trasformabile sia in vitro che in vivo senza nessun tipo di trattamento chimico.

Una serie di studi ha poi riguardato la specie *Ralstonia solanacearum*. Questo microrganismo ha due importanti caratteristiche: è un batterio naturalmente trasformabile e attacca più di duecento specie vegetali insediandosi e moltiplicandosi nei fasci vascolari delle piante. Gli esperimenti condotti hanno dimostrato che proprio la capacità di moltiplicarsi rapidamente rende plausibile il trasferimento di DNA tra la pianta e *R. solanacearum* durante la patogenesi. E' stato inoltre dimostrato che condizioni ambientali

quali la composizione chimica del substrato, gli shock termici ed elettrici possono determinare il trasferimento passivo di DNA alle cellule batteriche, contribuendo ad aumentare il flusso genetico. [Bertolla *et al.* 1997, Coupat *et al.* 2007]

I primi studi avevano dimostrato *R. solanacearum* è in grado di acquisire DNA intraspecifico; esperimenti successivi hanno poi dimostrato la capacità di *R. solanacearum* nell'acquisire anche DNA interspecifico e DNA delle diverse specie vegetali che infetta [Bertolla *et al.* 1999, Mercier *et al.* 2007].

1.4 I TRE BATTERI PATOGENI DEL POMODORO UTILIZZATI

PSEUDOMONAS SYRINGAE PV. TOMATO AGENTE DELLA MACCHIETTATURA BATTERICA POMODORO

La macchiettatura batterica del pomodoro, causata dal batterio Gram negativo *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, è stata osservata per la prima volta negli anni trenta del secolo scorso nell'isola di Formosa e negli Stati Uniti d'America anche se ormai è presente nella maggior parte delle aree di coltivazione del pomodoro. In Italia la presenza del patogeno è stata segnalata per la prima volta in Puglia nel 1949. [Iacobellis e Lo Cantore 2007] Il batterio sopravvive nei residui vegetali infetti (anche se solo per pochi giorni), nella rizosfera di piante coltivate e spontanee nonché nei semi di pomodoro infetti. Da qui, può colonizzare le foglie e mantenersi con una popolazione "residente" di bassa concentrazione, fino a quando permangono condizioni ambientali sfavorevoli ad una sua moltiplicazione (alte temperature, bassa umidità). In tali condizioni, il batterio può vivere come "epifita" su numerose piante infestanti e successivamente in presenza di temperature comprese tra i 13-25°C e con umidità superiore all'80%, si hanno notevoli possibilità di infezione. Alla diffusione del patogeno, oltre al seme e piantine infette/contaminate, contribuiscono anche insetti, acari, pratiche agronomiche, pioggia, vento e grandine.

I sintomi più evidenti sono sulle foglie dove inizialmente compaiono piccole aree idropiche di circa 1mm di diametro che successivamente necrotizzano e si circondano di aloni clorotici. Su ogni foglia possono comparire molte macule che quando confluiscono possono provocare la necrosi di ampie porzioni di lembo.

Su fusto e picciolo si sviluppano tacche necrotiche molto allungate mentre sui frutti si notano piccole macchioline nerastre leggermente in rilievo circondate da un alone idropico di colore verdastro nei frutti verdi e giallastro in quelli in via di maturazione.

La prevenzione della malattia va realizzata innanzitutto ricorrendo all'utilizzazione di cultivar resistenti, all'eliminazione e bruciatura dei residui vegetali infetti, alla rotazione colturale, all'uso di irrigazione a goccia, a concimazioni equilibrate. [Scortichini 1995; Iacobellis e Lo Cantore 2007]

Per la lotta è previsto l'uso di prodotti rameici anche se l'uso eccessivo e sconsigliato di prodotti a base di rame ha determinato la selezione di ceppi resistenti. Negli ultimi anni sono stati anche sperimentati metodi di lotta alternativi mediante sostanze in grado di indurre la SAR o mediante l'utilizzo di microorganismi antagonisti da utilizzare in programmi di lotta integrata. [Lows *et al.* 2001; Wilson *et al.* 2002].

La malattia risulta molto dannosa sia sulle cultivar da mensa che su quelle da industria e recentemente anni sono stati sviluppati numerosi metodi diagnostici molto specifici sia immunologici (immunofluorescenza) che molecolari (PCR). [Veena *et al.* 2002; Zaccardelli *et al.* 2005].

***RALSTONIA SOLANACEARUM* AGENTE DELL'AVVIZZIMENTO BATTERICO DEL POMODORO**

Ralstonia solanacearum (Smith) fu descritto per la prima volta come *Bacillus solanacearum* da Smith nel 1896, in seguito fu assegnato al genere *Pseudomonas*, prima che studi più approfonditi su alcune specie non-fluorescenti del genere *Pseudomonas* portarono alla identificazione del genere *Burkholderia* e all'interno di questo genere fu inquadrato il batterio con il nome di *Burkholderia solanacearum*. Successive indagini su questo genere, infine, hanno rilevato che *Burkholderia solanacearum* era sufficientemente distinta dagli altri membri del genere per giustificare l'assegnazione al recente genere proposto *Ralstonia*. Dato che la classificazione del batterio ha subito diverse revisioni nel corso degli anni, in letteratura è possibile ritrovarlo con i sinonimi di *Bacterium solanacearum* (Smith), *Burkholderia solanacearum* (Smith), *Pseudomonas solanacearum* (Smith). [Yabuuchi *et al.*, 1995].

R. solanacearum è un batterio fitopatogeno Gram negativo, con un'ampia cerchia di ospiti costituita da più di 200 specie vegetali sia coltivate che spontanee in zone tropicali, subtropicali e temperate.

La specie è molto eterogenea, composta da popolazioni distinguibili per gruppi di piante ospiti (razze) e/o per caratteri biochimici (biovar). Nel corso degli anni, con il susseguirsi degli studi sono state descritte almeno 5 razze e 5 biovar. [Buddenhagen *et al.*, 1962]

Razza 1 (temperatura ottimale di crescita di 35-37°C): attacca tabacco, pomodoro, patata, melanzana, banano diploide e numerose altre colture ed erbe spontanee dell'area tropicale (Figura 1.7)

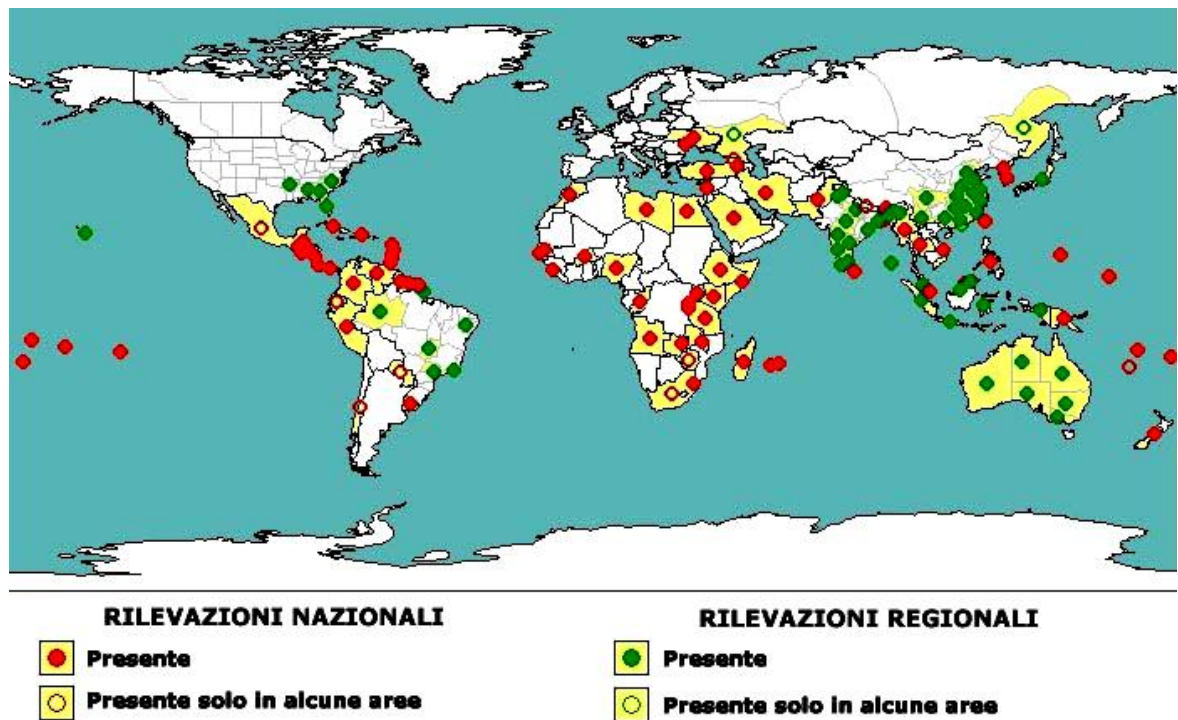


Fig. 1.7. Mappa di distribuzione della razza 1 di *Ralstonia solanacearum*

Razza 2 (temperatura ottimale di crescita di 35-37°C): tipica delle aree tropicali del Sud America (Figura 1.8), attacca banano triploide (causando il così detto “Moko”) e *Heliconia* spp, ma si ritrova anche nelle Filippine dove causa il “bugtok” del platano.

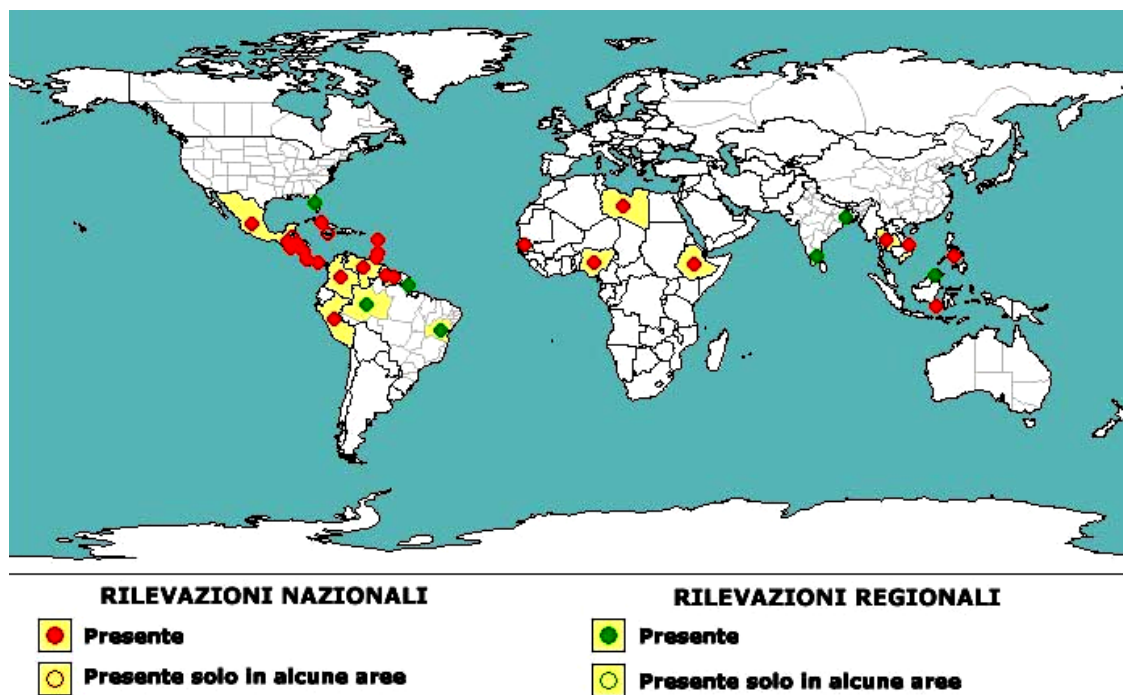


Figura 1.8. Mappa di distribuzione della razza 2 di *Ralstonia solanacearum*.

Razza 3 (temperatura ottimale di crescita di 27°C): si ritrova nelle alture delle zone tropicali e subtropicali nonché nei climi temperati (Figura 1.9), attacca principalmente patata e pomodoro, non mostrando elevata virulenza nei confronti delle altre Solanacee. Altri ospiti sono le erbe spontanee *Solanum dulcamara*, *Solanum nigrum*, *Solanum cinereum* (in Australia), la composita *Melampodium perfoliatum* (in Costa Rica) e *Pelargonium hortorum*. Spesso si ritrova in maniera non sintomatica su specie selvatiche non appartenenti alla famiglia delle Solanacee.

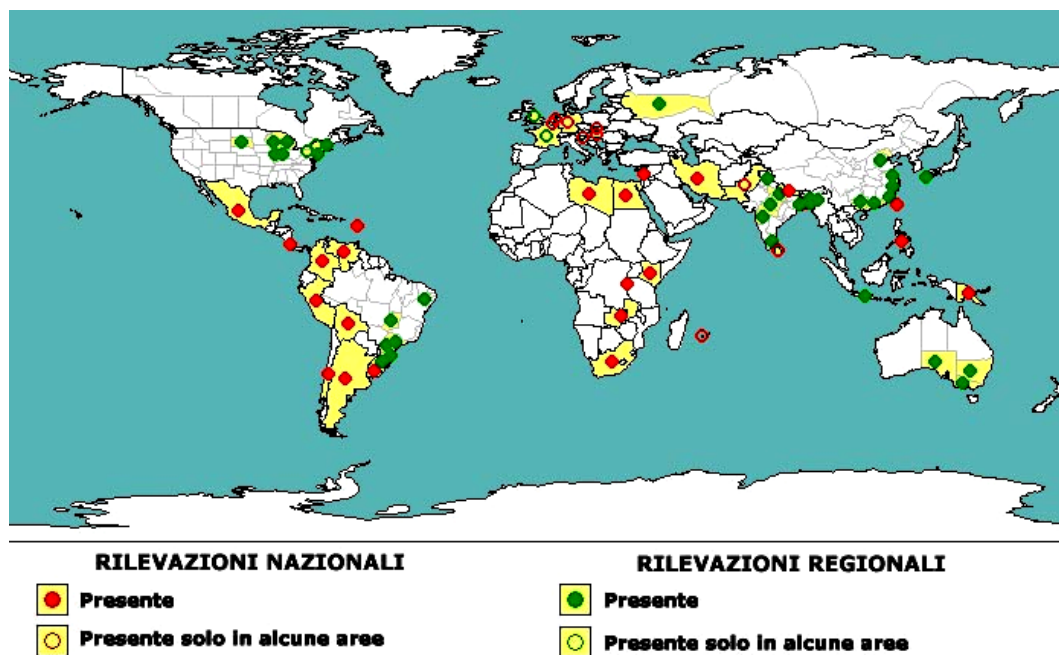


Figura 1.9. Mappa di distribuzione della razza 3 di *Ralstonia solanacearum*.

Razza 4 (temperatura ottimale di crescita di 35-37°C): particolarmente aggressiva nei confronti dello zenzero.

Razza 5 (temperatura ottimale di crescita di 35-37°C): specializzata nei confronti del genere *Morus* spp. [www.eppo.org]

Questo batterio è un patogeno da quarantena incluso nella lista A2 dell'EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization) ed è inoltre oggetto di un decreto di lotta obbligatoria (DM 23 Febbraio 2000) in cui sono descritte le misure di lotta tese a localizzarne la presenza, a determinarne la distribuzione, a prevenirne la comparsa e la disseminazione e a realizzare la sua eradicazione. [Iacobellis e Lo Cantore 2007]

L'avvizzimento batterico causato da *R. solanacearum* è una malattia sistemica particolarmente dannosa nelle zone a clima caldo e umido. La penetrazione nella pianta avviene, tipicamente, attraverso ferite provocate sugli organi ipogei dagli strumenti di lavorazione del terreno, da insetti o nematodi fitofagi, da infezioni fungine o da altre cause naturali e non (ad es. nel punto di origine delle radici secondarie).

Penetrato nell'ospite, il batterio raggiunge le strutture xilematiche, attraverso le quali si diffonde in tutte le direzioni. Lo sviluppo della malattia è favorito da elevata umidità del terreno e da temperature superiori a 20°C [Matta 1996].

La colonizzazione sistemica dei tessuti vascolari dell'ospite richiede la produzione, da parte di *R. solanacearum*, di polisaccaridi extracellulari ad alto peso molecolare (EPS) e di numerose proteine extracellulari (EXPs) che finiscono per occludere lo xilema, determinando l'avvizzimento repentino della pianta [Schell, 2000].

Per la disseminazione a breve distanza del patogeno, ha una notevole importanza epidemiologica la capacità di questa specie di sopravvivere nel terreno per un lunghissimo periodo, quando associato a residui vegetali infetti.

Il primo sintomo visibile è un avvizzimento delle foglie, che può interessare anche solo una parte della pianta (appassimento asimmetrico) durante le ore più calde, seguito da ripresa della vegetazione durante la notte; col progredire della malattia l'avvizzimento diventa irreversibile e porta la pianta al collasso nel giro di poco tempo.

Sezioni dei fusti di piante avvizzite evidenziano l'imbrunimento dei fasci vascolari e l'eventuale fuoriuscita di un liquido lattiginoso. Filamenti di mucillagine (masse batteriche) possono fuoriuscire dai fasci vascolari quando il fusto tagliato viene immerso verticalmente in acqua.

Il patogeno è stato eradicato in Italia e in molti altri paesi europei dopo che questo vi era giunto soprattutto attraverso tuberi seme di patata infetti provenienti dall'Egitto.

La lotta si basa soprattutto su criteri preventivi in quanto di fatto non esistono misure di lotta chimica da utilizzare in campo o in post raccolta; inoltre sebbene esistano cultivar commerciali resistenti alla malattia, la resistenza talvolta è stata superata e comunque non è utile contro tutte le razze del patogeno. Molti progetti di ricerca di miglioramento genetico, mirano a trasferire la resistenza al patogeno, presente in diversi genotipi di specie spontanee, in cultivar suscettibili. [Iacobellis e Lo Cantore 2007]

***PSEUDOMONAS CORRUGATA* AGENTE DELLA NECROSI DEL MIDOLLO DEL POMODORO**

Pseudomonas corrugata (Roberts and Scarlett 1981) è una specie batterica descritta per la prima volta alla fine degli anni settanta quale agente causale della “ necrosi del midollo del pomodoro.” [Scarlett *et al.* 1978].

Questa malattia si manifesta soprattutto in serre fredde a fine inverno – inizio primavera e nelle regioni meridionali è particolarmente pericolosa poiché può colpire anche coltivazioni in pieno campo. Il tipico sintomo della malattia è rappresentato dalla necrosi asciutta del midollo del fusto che infine diventa cavo.

I processi necrotici iniziano generalmente dal colletto e si possono estendere in senso acropeto per molti centimetri. Anche le radici principali e secondarie possono presentare aree interne imbrunite e necrotizzate. Sul fusto si evidenziano striature longitudinali necrotiche e nerastre, lo sviluppo di abbozzi radicali e radici avventizie e la decolorazione dei fasci vascolari; infine le foglie manifestano clorosi e le piante, in generale, mostrano una crescita stentata e, nella fase terminale della malattia, possono avvizzire. [Iacobellis e Lo Cantore 2007]

I principali fattori che favoriscono l'insorgere della malattia sono le forti escursioni termiche tra il giorno e la notte nelle serre fredde, eccessive irrigazioni e concimazioni azotate; introduzione di sementi già infetti in serre sterilizzate. E' possibile cercare di limitare le infezioni ricorrendo ad alcuni accorgimenti come per esempio rotazioni ampie, concimazioni ed irrigazioni equilibrate, aerazione delle serre al mattino, sterilizzazione in vivaio del terreno ospitante i sementi.

Per combattere questa batteriosi si può anche ricorrere a trattamenti con prodotti rameici che però hanno solo un'azione di contenimento delle infezioni secondarie. [Scortichini 1995]

P. corrugata è un batterio polifago e ubiquitario ed è stato isolato oltre che da un'ampia gamma di specie vegetali asintomatiche anche da rizosfera di piante coltivate e spontanee, sia in ambienti diversi che in paesi diversi. [Catara 2007; Licciardello *et al.* 2007; Guo *et al.* 2007 Scortichini 1989] Questa specie è molto abile a colonizzare la rizosfera di pomodoro e ad iniziare la colonizzazione endofitica della pianta iniziando dall'inoculo presente nel suolo.

P. corrugata penetra nella pianta attraverso ferite sullo stelo, sul colletto e su radici [Scarlett *et al.* 1978; Bella *et al.* 2003]; la malattia può avere un periodo di incubazione molto lungo durante il quale o non sono visibili sintomi o gli stessi sono molto lievi.

La microscopia elettronica a scansione (SEM) ha mostrato cellule di *P. corrugata* che colonizzano i tessuti parenchimatici delle piante di pomodoro associate a materiali che è possibile supporre siano polisaccaridi extracellulari (EPS), che li tengono aderenti alla superficie della parete cellulare [Coco *et al.* 2001]. Le osservazioni al SEM sono coerenti con la descrizione dei biofilm batterici in pianta e non è escluso che anche per *P. corrugata*, la colonizzazione dei tessuti e/o della rizosfera possa essere associata alla produzione di biofilm, visto che è stato dimostrato che alcuni ceppi di *P. corrugata* producono biofilm *in vitro*. [Catara 2007; Scortichini 1995; Ude *et al.* 2006]

Altra caratteristica importante di questa specie è la capacità di sopravvivere nel terreno per molto tempo, è stato infatti dimostrato che inoculando in terreno sabbioso *P. corrugata*, la popolazione batterica resta invariata anche dopo un campionamento effettuato 19 settimane dopo l'inoculo.[Greco *et al.* 2002]

Queste caratteristiche rendono la specie *P. corrugata* una candidata ideale per un possibile trasferimento genico orizzontale; infatti la lunga persistenza nel suolo unita al fatto che il DNA vegetale rilasciato durante la degradazione dei tessuti può persistere in uno "status" biologicamente attivo per un lungo periodo di tempo, anche superiore a 120 giorni [Widmer *et al.* 1996] , potrebbe rendere questa specie suscettibile di acquisire DNA esogeno proveniente da pianta o da residui di vegetazione transgenici.

1.5 SCOPO DELLA TESI

Lo scopo di questo lavoro di tesi è stato valutare la possibilità di trasferimento genico orizzontale di DNA, di differente natura, a batteri fitopatogeni. I batteri fitopatogeni potrebbero essere interessati dal fenomeno del trasferimento genico orizzontale in virtù del fatto che, durante il processo patogenetico le cellule vegetali vanno incontro a lisi rilasciando il DNA che potrebbe così essere disponibile per essere acquisito da batteri competenti.

E' stato utilizzato un modello basato sull'impiego di batteri fitopatogeni ricombinanti contenenti sequenze del gene *nptII* omologhe a quelle presenti in linee di pomodoro transgeniche (BBS). E' stata quindi verificata la capacità di questi batteri di integrare nel proprio genoma DNA esogeno mediante il meccanismo della ricombinazione omologa. Sono state scelte tre importanti specie batteriche del pomodoro che presentavano caratteristiche differenti:

1. *Pseudomonas syringae* pv.*tomato* specie epifita, poco competitiva e quindi poco persistente nel suolo. (Patogeno fogliare)
2. *Ralstonia solanacearum*, specie batterica da quarantena, ottimo competitore nel suolo e in grado di distruggere completamente la pianta in pochissimi giorni. (Patogeno sistemico)

3. *Pseudomonas corrugata* specie polifiga, ubiquitaria e in grado di sopravvivere sia nelle piante infette che nel suolo anche senza l'ospite per molti mesi. (Patogeno tellurico)

La prima fase del lavoro ha riguardato principalmente la costruzione di plasmidi contenenti il gene *AnptII* che è un omologo, reso non funzionante da una delezione nella parte centrale del gene, del gene *nptII* presente nelle linee di pomodoro transgenico. Con tali plasmidi sono state trasformate geneticamente le tre specie batteriche fitopatogene. I batteri ricombinanti sono stati quindi utilizzati per verificare il ripristino del gene *AnptII* in seguito a ricombinazione con il gene *nptII* presente nelle piante di pomodoro BBS.

La seconda parte del lavoro è stata invece incentrata sullo studio del trasferimento genico orizzontale in *Pseudomonas corrugata*, che è risultata la specie più facilmente trasformabile. Sono state effettuate prove di trasformazione sia in vitro sia in condizioni da simulare ambienti naturali e anche direttamente inoculando i patogeni ricombinanti nelle piante di pomodoro transgeniche.

Le frequenze di trasformazione sono state infine confrontate con quelle dei batteri tellurici *Acinetobacter baylyi* e *Pseudomonas stutzeri*, che rappresentano le due specie modello per gli studi sul trasferimento orizzontale di geni da piante transgeniche

2. MATERIALI E METODI

2.1 MATERIALE VEGETALE

Le piante di pomodoro utilizzate sono state: *Solanum lycopersicon* appartenenti alla varietà Better Boy (di seguito indicate con la sigla BB), *Solanum lycopersicon* appartenenti alla varietà Better Boy trasformate con il cDNA del gene della prosistemina sotto il controllo del promotore costitutivo 35S (di seguito indicate con la sigla BBS) e contenenti *nptII* come gene marcatore. [McGurl *et al.* 1994] (Fig. 2.1)

Le piante di pomodoro geneticamente modificate BBS, ci sono state fornite dall' Istituto di Genetica Vegetale (IGV) del CNR, Portici .

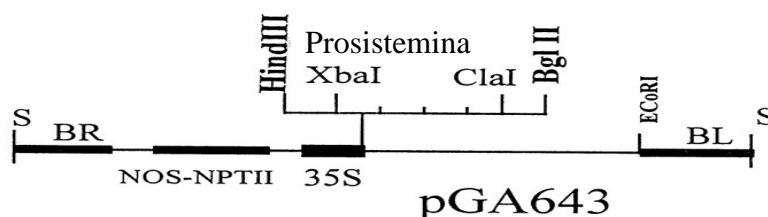


Fig. 2.1 Costrutto inserito nelle piante di pomodoro

2.2 CEPPI BATTERICI E PLASMIDI

I ceppi batterici ed i plasmidi utilizzati in questo studio sono riportati nelle tabelle 2.1 e 2.2. Tutti i ceppi di *Escherichia coli* sono stati incubati a 37°C mentre i ceppi batterici fitopatogeni e le specie telluriche a 28°C. Tubi di vetro 18x180 mm sono stati utilizzati per tutte le colture batteriche con volumi inferiori ai 10 ml, mentre beute Erlenmeyer da 50, 125 o 250 ml sono state utilizzate per colture batteriche allevate in volumi superiori ai 10 ml. Tutte le colture liquide sono state insemenate partendo da colture su substrato solido NAG insemenate con cellule batteriche provenienti da sospensioni in stock di glicerolo.

Tab. 2.1: Ceppi ed isolati batterici

Ceppi ed isolati	Caratteristiche	Riferimenti
<i>Pseudomonas corrugata</i>	wild type Rif ^R	Questo studio
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	wild type Rif ^R	Questo studio
<i>Ralstonia solanacearum</i>	wild type	Questo studio
<i>Acinetobacter baylyi</i> BD413	<i>trpE27</i>	De Vries and Wackernagel, 1997
<i>Pseudomonas stutzeri</i> Lo147	genotypic group A	Lorenz and Sikorski, 2000
<i>E.coli</i> HB101	supE44, Δ(<i>mcrC-mrr</i>), <i>recA13</i> , <i>ara-14</i> , <i>proA2</i> , <i>lacY1</i> , <i>galK2</i> , <i>rpsL20</i> , <i>xyl-5</i> , <i>mtl-1</i> , <i>leuB6</i> , <i>thi-1</i>	GIBCO-BRL
<i>E.coli</i> DH5α λ <i>pir</i>	sup E44, DlacU169 (F80lacZDM15), <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , λ <i>pir</i> phage lysogen	Biomedal S.L.
<i>E.coli</i> S17 λ <i>pir</i>	Tp ^R Sm ^R <i>recA</i> , <i>thi</i> , <i>pro</i> , <i>hsdR</i> M ⁺ RP4: 2-Tc:Mu: Km Tn7 λ <i>pir</i>	Biomedal S.L.
<i>P. corrugata</i> <i>chr::ΔnptII</i>	Km ^S Gent ^R Rif ^R	Questo studio
<i>P. corrugata</i> <i>chr::nptII</i>	Km ^R Gent ^R Rif ^R	Questo studio

Tab. 2.2: Plasmidi e costrutti

Vettori plasmidici	Caratteristiche rilevanti	Riferimento
pUTminiTn5 Km	pUTmini-Tn5 derived vector; Kan ^R Amp ^R , mini-Tn5 suicide donor	Biomedal
pGem® T-Easy	Cloning vector; Amp ^R <i>lacZ</i> reporter	Promega Corporation
pGemKan	pGem T-Easy with <i>nptII</i> gene cloned in EcoRI sites	Questo lavoro
pBluescript II KS	Cloning vector; Amp ^R <i>lacZ</i> reporter	Stratagene
pBluenptII	pBlueScript with 1.3 Kb insert pGemKan cloned in EcoRI site	Questo lavoro
pBlueΔnptII	pBluenptII with 315bp deletion in NcoI-Tth111I	Questo lavoro
pLafR3	cos <i>rlx</i> ⁺ Tet ^R IncP1	Staskawowicz <i>et al.</i> 1987
pLafR3nptII	pLAFR3 with 1.2Kb insert pBluenptII in BamHI-HindIII sites	Questo lavoro
pLAFR3ΔnptII	pLAFR3 with 0.9Kb insert pBlueΔnptII in BamHI-HindIII sites	Questo lavoro
pAG408 (plasmide suicida)	<i>bla</i> , Gent ^R <i>tnp</i> , MiniTn5 transposase, ori R6K, oriT RP4	Suarez <i>et al.</i> 1997
pAG408ΔnptII(plasmide suicida)	pAg408 with <i>ΔnptII</i> insert pBlueΔnptII in KpnI-NotI sites	Questo lavoro
pAG408nptII	pAg408 with <i>nptII</i> insert in KpnI-NotI sites	Questo lavoro
pMR7	pKT210 Cm ^R with <i>nptII</i> inactivated by a 10 bp deletion in NcoI site	Bagdasarian <i>et al.</i> 1981

2.3 SUBSTRATI, SOLUZIONI E CONDIZIONI DI CRESCITA

Tutti i substrati colturali e le soluzioni utilizzati nel corso del lavoro sono stati riportati nelle tabelle 2.3 e 2.4.

Il substrato LB liquido ed agarizzato è stato utilizzato sia per i ceppi di *E. coli* che per i ceppi fitopatogeni. Gli antibiotici e le sostanze reporter sono stati utilizzati alle seguenti concentrazioni: rifampicina 100 mg/L, kanamicina 50 mg/L and X-Gal 2%. La tetraciclina è stata utilizzata ad una concentrazione di 25mg/L per i ceppi di *E. coli* e 50 mg/L per i ceppi patogeni, il cloramfenicolo è stato utilizzato alla concentrazione di 60mg/L mentre la gentamicina ad una concentrazione di 15mg/L. Tutti i ceppi utilizzati nel corso del lavoro sono stati conservati in una sospensione di glicerolo al 30% a -20°C.

Tabella 2.3: Substrati utilizzati

Substrato	Ingredienti	Substrato	Ingredienti
Luria Bertani(LB) broth/agar	10 g Bacto Tryptone Peptone 5 g Yeast Extract 5 g NaCl 1000 ml ddH ₂ O 15 g Agar	Minimal Medium 9 M9 broth/agar	50 ml 20X M9salts 2 ml 1M MgSO ₄ x7H ₂ O 10 ml 20% glucosio 100 ml 1M CaCl ₂ 2 ml 1mg/ml Thiamine
Nutrient Agar Glucose NAG broth/agar	8 g Nutrient broth 2.5 g glucosio 1000 ml ddH ₂ O 18 g Agar		2 ml 1mg/ml Biotine 940 ml H ₂ O 15 g Agar pH 7.4
AB Medium	pH 7 Sali AB (20X) Buffer AB (20X) 900 ml ddH ₂ O 15 g Agar	Biolog Universal Growth(BUG Agar)	36 g BUG 1000 ml ddH ₂ O 15 g Agar
King's Medium B KMB Agar	20 g Proteose peptone 1.5 g KH ₂ PO ₄ 1.5 g MgSO ₄ x 7H ₂ O 10 ml glicerolo 1000 ml ddH ₂ O 15 g Agar	Casamino acid-Peptone-Glucose CPG broth/agar	10 g triptone 5 g glucosio 1 g Csoamino Acids 1 g estratto lievito 1000 ml ddH ₂ O 15 g Agar

Tabelle 2.4: Soluzioni utilizzate

Soluzioni	Ingredienti	Soluzioni	Ingredienti
20X M9 salts	60 g Na ₂ HPO ₄ 30 g KH ₂ PO ₄ 10 g NH ₄ Cl 5 g NaCl 400 ml ddH ₂ O	TE 10X	100 ml 1M Tris-HCl 20 ml 0.5M EDTA pH8 880 ml ddH ₂ O pH 8
Alkaline lysis solution I	0.45 g glucosio 5 ml 250mM Tris pH8 5 ml 100mM EDTApH8 40 ml ddH ₂ O	Sali AB 20X	20 g NH ₄ Cl 6 g MgSO ₄ 3 g KCl 50 mg FeSO ₄ 0.2 g CaCl ₂
Alkaline lysis solution II	0.8 g NaOH 1 g SDS 100 ml ddH ₂ O	Buffer AB (20X)	60 g KH ₂ PO ₄ 23g NaH ₂ PO ₄ pH 7
Alkaline lysis solution III	14.7 g CH ₃ COOK 5.75 ml CH ₃ COOH glaciale 44.25 ml ddH ₂ O	TSS solution	85 ml LB broth 10 g PEG 5 ml DMSO 1.1 g MgCl ₂
TAE 10X	0.4 M Tris-base 11.4%(v/v) CH ₃ COOH glaciale 10mM EDTA pH 7.6 (con CH ₃ COOH)	Cristal Violetto 1%	1 g Cristal violetto 100ml ddH ₂ O
Soluzione fisiologica	8 g NaCl 1000 ml ddH ₂ O	KOH 3%	3 g KOH 100 ml ddH ₂ O

2.4 CARATTERIZZAZIONE DEI CEPPI BATTERICI UTILIZZATI

Tutti i ceppi batterici utilizzati nel lavoro, sono stati osservati e ne sono stati registrati i caratteri fenotipici: forma, consistenza, colore, regolarità delle colonie realizzando un'analisi morfologica completa. In seguito, ogni isolato è stato sottoposto al test del KOH [Suslow *et al.* 1982]. Tale metodo può sostituire la tecnica di colorazione Gram e ha il vantaggio di essere molto più rapido, meno tossico e altrettanto attendibile. Tramite un'ansa sterile si preleva un'aliquota della colonia batterica cresciuta su substrato agarizzato; la si stempera, con movimento rapido e circolare, in una goccia di KOH, concentrato al 3%, posta su un vetrino, preventivamente sgrassato. Se sollevando l'ansa si nota la formazione di un sottile filamento mucoso si ritiene il test positivo e il batterio è considerato Gram negativo;

nel caso di assenza di filamento, il test è negativo e il batterio Gram positivo. Tutti i ceppi batterici utilizzati sono risultati Gram negativi e sono stati identificati con precisione mediante un'accurata caratterizzazione fisiologica.

Caratterizzazione fisiologica tramite BIOLOG™

Il metodo Biolog™ (Fig 2.2) permette l'identificazione delle specie microbiche attraverso la definizione di un profilo nutrizionale. Il test consiste nel saggiare contemporaneamente per ogni isolato batterico la capacità di utilizzare un'ampia gamma di composti organici come fonte di carbonio. Il sistema è costituito da una piastra a 96 pozzetti di cui 95 contengono differenti fonti di carbonio e uno che non ne contiene alcuna e che funge da controllo negativo (tali piastre contengono composti differenti a seconda che si voglia identificare una specie Gram- o Gram+). L'assimilazione del composto provoca un aumento del tasso di respirazione che riduce l'indicatore (tetrazolio) presente nel pozzetto, facendolo virare al colore porpora.

Gli isolati da identificare sono stati incubati per 24 ore a 28°C in un incubatore termostato su mezzo agarizzato BUG (Biolog Universal Growth) e risospesi in tubi di vetro contenenti "GN/GP Inoculating fluid".

La concentrazione batterica è stata poi corretta fino a raggiungere una densità ottica, letta a 560 nanometri, di 0.12 corrispondente a 3×10^8 cfu/ml. I singoli pozzetti delle piastre BIOLOG GN2 sono stati insemenzati con 150 μ l di sospensione del batterio.

Le piastre sono poi state incubate a 28°C per 24 ore. La lettura delle piastre è stata effettuata dopo 18-20 h dall'inoculazione utilizzando il lettore di piastre BIOLOG "MicroStationSystem"

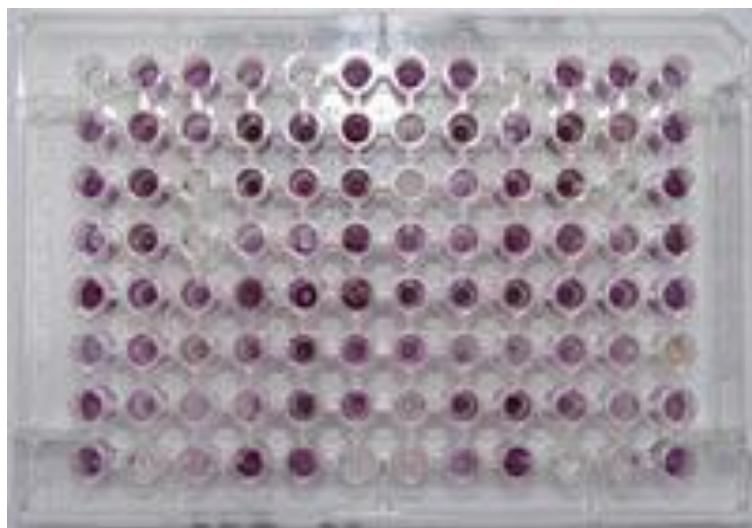


Fig. 2.2 Piastra Biolog™ inoculata

2.5 PROVE DI PATOGENICITÀ

Le capacità patogenetiche di tre specie batteriche (*Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas syringae* pv *tomato* e *Ralstonia solanacearum*) sono state saggiate, in serra e in condizioni controllate, su piante di *Solanum lycopersicum* della varietà Better Boy.

Le colonie batteriche da testare per la patogenicità sono state prelevate e poste in tubi con soluzione fisiologica ottenendo una sospensione batterica concentrata che è stata poi diluita in ddH₂O fino a raggiungere una concentrazione pari a 1×10^8 c.f.u./ml calcolata mediante lettura allo spettrofotometro. L'inoculo del batterio nella pianta è avvenuto con le metodiche specifiche per ogni ceppo batterico. In particolare *Pseudomonas syringae* pv *tomato* è stata inoculata con il metodo della nebulizzazione, *Pseudomonas corrugata* mediante infiltrazione nel midollo e infine *Ralstonia solanacearum* mediante inoculazione diretta del patogeno su radici precedentemente ferite mediante taglio.

Per i test di patogenicità eseguiti con *Pseudomonas syringae* pv *tomato* e *Ralstonia solanacearum* sono state utilizzate piante di pomodoro BB alte circa 25 cm. E' stato effettuato un isolamento dopo 10-12 giorni dall'inoculo poi le piante deperivano rapidamente.

Per l'inoculo di *Pseudomonas corrugata* sono state utilizzate sia piante adulte in piena fioritura e con frutti prossimi alla maturazione, sia piante più giovani con vegetazione molto attiva. Le piante di pomodoro della cultivar Better Boy (BB), accresciute in vasetti e mantenute in serra alla temperatura di 23-25°C e umidità relativa del 45-65%, sono state controllate periodicamente per osservare la comparsa dei sintomi e dopo circa 20 giorni sono stati eseguiti i primi isolamenti prelevando da ciascuna pianta uno o più campioni sintomatici; gli isolamenti sono stati ripetuti dopo altri 20 giorni

Come controllo per tutte le prove di patogenicità sono state utilizzate piantine inoculate allo stesso modo con acqua distillata sterile

2.6 ISOLAMENTO E CONTE MICROBICHE

I campioni infetti, una volta condotti in laboratorio, sono stati sottoposti alle procedure più adatte all'isolamento di colonie batteriche pure. I campioni vegetali sono stati ripuliti esternamente con lavaggio sotto acqua corrente e successivi risciacqui con acqua sterile.

Porzioni di tessuto infette sono state frammentate e pesate ottenendo campioni di 500 mg che sono stati macinati in mortaio con 4,5 ml di soluzione fisiologica e lasciati riposare per circa 20 minuti affinché i batteri adesi al campione si liberassero in sospensione. La sospensione è stata diluita serialmente, aggiungendo a 4,5 ml di soluzione fisiologica 500µl della sospensione batterica. In questo modo è stata ottenuta una prima diluizione in base 10, indicata convenzionalmente come 10^{-1} .

Da questa ultima sono stati prelevati altri 500 µl, i quali a loro volta sono stati trasferiti in 4,5 ml di soluzione fisiologica, ottenendo così la diluizione 10^{-2} e si è proceduto fino alla diluizione 10^{-6} .

Dalle suddette diluizioni, aliquote di 100 µl sono state spatolate sulla superficie di piastre di Petri contenenti substrato NAG agarizzato. Le piastre sono state successivamente incubate a 28°C per 24/48 ore al fine di ottenere colonie batteriche isolate. Si è lavorato con serie da tre piastre per ogni diluizione. Al termine di ogni prova sono state effettuate conte microbiche al fine di stimare la capacità di colonizzazione e moltiplicazione dei batteri nelle piante. Per contare i batteri presenti nei tessuti vegetali delle piante di pomodoro è stato utilizzato NAG come mezzo di coltura a cui è stato addizionato l'antibiotico specifico.

2.7 ESTRAZIONE DI DNA PLASMIDICO

Per l'estrazione di DNA plasmidico sono stati utilizzati due diversi protocolli a seconda della qualità e quantità di DNA richiesta.

Il Kit della Invitrogen Pure Link Quick Plasmid Miniprep è stato utilizzato per l'estrazione plasmidica con il fine di ottenere un buon grado di purezza del DNA plasmidico destinato ad essere manipolato e sequenziato.

Il metodo Sambrook and Russel MidiprepARATION è stato invece utilizzato quando si è reso necessario estrarre maggiori quantità di DNA plasmidico.

ESTRAZIONE DNA PLASMIDICO CON PURE LINK QUICK PLASMID MINIPREP

- Allevare i batteri in 5 ml di LB addizionato con l'antibiotico specifico per garantire il mantenimento del plasmide per 16-18 ore alla temperatura adeguata
- Trasferire 1 ml di coltura batterica in contenitori da 2 ml e successivamente centrifugare ad una velocità di 4000 rpm a temperatura ambiente per 15 min.
- Lasciare asciugare il precipitato e risospendere il pellet in 250 µl di Resuspension Buffer R3
- Aggiungere 250 µl di Lysis Buffer L7 e miscelare delicatamente invertendo il contenitore per 5 volte
- Incubare il campione per 5 minuti a temperatura ambiente.
- Aggiungere 350 µl di Precipitation Buffer N4 e miscelare immediatamente invertendo il tubo per 5 volte
- Centrifugare a 11200 rpm per 10 min
- Porre una colonnina di silice che lega il DNA in un nuovo tubo da 2 ml e aggiungere il supernatante dello step precedente
- Centrifugare a 11200 rpm per 1 minuto ed eliminare il fuoriuscito
- Aggiungere 500 µl di Wash Buffer W10 alla colonnina e incubare per 1 min a temperatura ambiente
- Centrifugare a 11200 rpm per 1 min ed eliminare il fuoriuscito
- Aggiungere 700 µl di Wash Buffer W9 alla colonnina e centrifugare a 11200 rpm per 1 min. Eliminare il fuoriuscito
- Centrifugare a 11200 rpm per 1 min per rimuovere i residui di W9 ed eliminare il fuoriuscito
- Porre la colonna in un nuovo tubo da 1.5 ml e aggiungere 75 µl di TE Buffer preriscaldato (65-70°C)
- Incubare per 1 min. a temperatura ambiente e centrifugare a 11200 rpm per 2 min.

L'eluato contiene il DNA plasmidico

MIDIPREPARATION SAMBROOK AND RUSSEL

- Allevare i batteri in 10 ml di LB addizionato con l'antibiotico specifico per garantire il mantenimento del plasmide, per 16-18 ore alla temperatura adeguata
- Trasferire tutta la coltura in un contenitore da 15 ml e centrifugare a 4000 rpm per 10 min. a 4°C
- Lasciare asciugare il precipitato e risospendere il pellet in 200 µl di Alkaline lysis solution I freddo e trasferire la sospensione in un contenitore da 2 ml
- Aggiungere 400 µl di Alkaline lysis solution II (preparato fresco) e miscelare gentilmente invertendo il tubo per 5 volte
- Aggiungere 300 µl di Alkaline lysis solution III freddo e miscelare bene invertendo il tubo molte volte e riporre su ghiaccio per 3-5 min
- Centrifugare a 13000 rpm per 5 min. a 4°C e trasferire 600 µl del surnatante in un nuovo contenitore
- Aggiungere un volume uguale di fenolo:cloroformio e miscelare la fase organica e acquosa con il vortex
- Centrifugare alla massima velocità per 2 min a 4°C e trasferire la fase acquosa in un nuovo contenitore
- Aggiungere 600 µl di isopropanolo a temperatura ambiente per precipitare gli acidi nucleici, miscelare bene la soluzione e lasciare 2 min. a temperatura ambiente
- Centrifugare alla massima velocità per 5 min a temperatura ambiente
- Rimuovere delicatamente il supernatante e lasciar asciugare bene il precipitato
- Aggiungere 1 ml di etanolo 70% al pellet e centrifugare alla massima velocità per 2 min. a temperatura ambiente
- Rimuovere delicatamente il supernatante e lasciare il tubo aperto finché l'etanolo non sarà evaporato completamente
- Risospendere gli acidi nucleici precipitati in 100 µl di TE (pH8) contenente 20µg/ml RNase
- Conservare il DNA estratto a -20°C

La qualità del DNA estratto è stata verificata mediante corsa elettroforetica orizzontale in gel di agarosio allo 0.8% colorato con Bromuro di Etidio (10mg/ml).

2.8 ESTRAZIONE DI DNA GENOMICO

Il DNA genomico è stato estratto dai ceppi batterici utilizzando il Kit Wizard Genomic DNA Purification Kit mentre il DNA delle piante di pomodoro var. BB e BBS è stato estratto utilizzando il kit Invitrogen PureLink Plant Total DNA Purification

ESTRAZIONE DNA GENOMICO BATTERICO CON WIZARD GENOMIC DNA PURIFICATION KIT

- Aggiungere 1 ml di una coltura O/N a un tubo di 1.5 ml
- Centrifugare a 13,000-16,000 x g per 2 min per far precipitare le cellule. Rimuovere il supernatante
- Aggiungere 600 µl di Nuclei Lysis Solution. Pipettare delicatamente fino a che le cellule si risospendono
- Incubare a 80°C per 5 min per lisare le cellule; poi lasciare raffreddare il campione a temperatura ambiente
- Aggiungere 3 µl di Rnase Solution alle cellule lisate. Invertire il tubo 2-5 volte per miscelare
- Incubare a 37°C per 15-60 min. Raffreddare a temperatura ambiente
- Aggiungere 200 µl di Protein Precipitation Solution alle cellule lisate trattate con Rnase. Agitare su vortex velocemente e vigorosamente per 20 sec
- Incubare il campione in ghiaccio per 5 min
- Centrifugare a 13000 rpm per 3 min
- Trasferire il supernatante contenente il DNA a un nuovo tubo da 1.5 ml che contiene 600 µl di isopropanolo a temperatura ambiente
- Miscelare gentilmente invertendo il tubo fino a che il filamento di DNA non forma una massa filamentosa visibile
- Centrifugare a 13000 per 2 min
- Eliminare delicatamente il supernatante e lasciare asciugare il pellet
- Aggiungere 600 µl di etanolo 70% a temperatura ambiente ed invertire delicatamente il tubo diverse volte per pulire il pellet di DNA
- 13. Centrifugare a 13000 rpm per 2 min. Eliminare accuratamente l'etanolo
- Lasciare asciugare il tubo e far asciugare il pellet per 10-15 min

- Aggiungere 100 µl di DNA Rehydration Solution al tubo e reidratare il DNA incubandolo a 65°C per 1 ora
- Conservare il DNA a 2-8°C

ESTRAZIONE DNA DA TESSUTI VEGETALI CON IL KIT INVITROGEN PURELINK PLANT TOTAL DNA PURIFICATION

Preparazione del lisato vegetale

1. Aggiungere 250 µl di Resuspension Buffer (R2) a 100 mg di tessuto vegetale
2. Preparare il lisato omogeneizzando il tessuto
3. Aggiungere 15 µl di SDS (20%) e 15 µl di Rnase A (20mg/ml) al lisato
4. Incubare a 55°C per 15 min per avere una lisi completa
5. Centrifugare alla max velocità per 5 min
6. Trasferire il supernatante in un nuovo tubo e aggiungere 100 µl di Precipitation Buffer (N2)
7. Miscelare bene e incubare in ghiaccio per 5 min
8. Centrifugare alla max velocità a temperatura ambiente per 5 min
9. Trasferire 250 µl di lisato chiarificato in un nuovo tubo e aggiungere 375 µl di Binding Buffer (B4), miscelare bene

Legame e lavaggio del DNA

1. Aggiungere il campione (Step 9) alla colonnina Pure link
2. Centrifugare a 10200 rpm per 30 sec a temperatura ambiente
3. Eliminare il fuoriuscito e porre la colonnina in un nuovo tubo
4. Aggiungere 500 µl di Wash Buffer (W4) e centrifugare a 10200 rpm per 30 sec. Eliminare il fuoriuscito
5. Aggiungere 500 µl di Wash Buffer (W5) e centrifugare a 10200 rpm per 30 sec. Eliminare il fuoriuscito
6. Ripetere lo step 5 nuovamente
7. Centrifugare alla max velocità per 2 min. per eliminare i residui di etanolo
8. Eliminare il fuoriuscito

Eluizione del DNA

1. Porre la colonnina in un nuovo tubo
2. Aggiungere 100 µl di Elution Buffer o di acqua sterile pH7
3. Incubare a temperatura ambiente per 1 min e centrifugare alla max velocità per 1 min

4. Ripetere step 2 e 3

5. Il fuoriuscito conterrà il DNA purificato

La qualità del DNA estratto è stata verificata mediante corsa elettroforetica orizzontale in gel di agarosio allo 0.8% colorato con Bromuro di Etidio (10mg/ml).

La quantificazione è stata eseguita comparando l'intensità delle bande del DNA estratto con quelle del marker quantitativo λ DNA/HindIII.

2.9 REAZIONI DI AMPLIFICAZIONE

Tutti i primer utilizzati nel corso del lavoro sono riportati nella tabella 2.5.

Tab. 2.5 Inneschi utilizzati nel corso del lavoro

Nome oligo	Sequenza	Provenienza
Kan1	5'-tgctaaaggaagcggaac-3'	Questo studio
Kan2	5'-cgaagaactccagcatga-3'	Questo studio
GMKanF	5'-ggatctcgtcgtgacccat-3'	Questo studio
GMKanR	5'-gaaatctcgtgatggcagg-3'	Questo studio
pilT F	5'-ttgatcagcacctcgatgac-3'	Questo studio
pilT R	5'-caccagaattgcacgtcac-3'	Questo studio

Tutti gli oligonucleotidi riportati in tabella sono stati disegnati mediante un approccio bioinformatico utilizzando le sequenze presenti nella banca dati del National Center for Bioinformaic Information (NCBI). [www.ncbi.nlm.nih.gov] Le sequenze di interesse sono state poi inserite nel programma informatico di disegno primers Genamics Expression. Tale programma permette di stabilire una serie di parametri per la costruzione dei primer quali temperatura di melting, percentuale di GC, lunghezza del primer ecc.

SEQUENZIAMENTO DEGLI AMPLIFICATI

Gli amplificati ottenuti dalle PCR sono stati sequenziati dalla ditta Primm Biotech Services And Products, sede di Napoli, alla quale sono stati inviati i prodotti di amplificazione purificati e le sequenze dei primers utilizzati nella fase di amplificazione.

I risultati dei diversi sequenziamenti sono stati elaborati attraverso l'uso del software di pubblico accesso <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> NCBI nucleotide-nucleotide BLAST

PRIMERS KAN1/KAN2

La coppia di primers denominata Kan1/Kan2 è stata disegnata in posizione 543-1816 del plasmide pUT mini Tn5. Tale coppia di inneschi producevano un amplicone di 1274bp contenente l'intera sequenza del gene *nptII* comprensiva di promotore oppure un amplicone di 959 bp corrispondente al gene *nptII* deleto ($\Delta nptII$).

La reazione di PCR è stata eseguita utilizzando il termociclatore MyCycler della BIORAD. L'amplificazione è stata realizzata in un volume finale di 50 μ l utilizzando la miscela di reazione qui riportata (Tab. 2.6)

Tab. 2.6 Miscela di reazione con i primers Kan1/Kan2

Reagenti	Concentrazione finale
PCR Buffer (10X)	1x
dNTPs (10mM)	20 μM di ciascun nucleotide
MgCl₂ (15mM)	1.5 mM
Primer kan1 (10mM)	0.1 μM
Primer kan2 (10mM)	0.1 μM
Taq polimerasi (5U/μl)	2.5 U
DNA	10 ng
Acqua	Per giungere a volume

I cicli termici secondo cui si è svolta la reazione hanno previsto un'iniziale denaturazione a 94°C per 4 min, seguita dalla ripetizione di 35 cicli a 94°C per 1 min, 52°C per 1 min e 72°C per 1 min, e quindi un'estensione finale a 72°C per 10 min.

Il prodotto della PCR è stato poi visualizzato mediante corsa elettroforetica orizzontale in gel di agarosio all'1% colorato con una soluzione di bromuro di etidio (10 mg/ml).

Le bande ottenute sono state confrontate con lo standard di pesi molecolari del 1KB plus (Invitrogen). Il gel è stato poi fotografato in seguito ad esposizione ai raggi UV.

Una volta sequenziati i prodotti di amplificazione, le sequenze ottenute sono state allineate mediante il programma bioinformatica gratuito di NCBI bl2seq che allinea due o più sequenze. Mediante tale programma è stato possibile visualizzare la differenza di basi tra i geni *nptII* e *ΔnptII*.

Primers GMKanF/GMKanR

La presenza del gene *nptII* nelle piante di pomodoro transgeniche BBS è stata accertata mediante reazioni di amplificazione eseguite utilizzando la coppia di primers, denominata GmKanF-GMKanR. La reazione di PCR è stata eseguita utilizzando il termociclatore MyCycler della BIORAD. L'amplificazione è stata realizzata in un volume finale di 50 µl utilizzando la miscela di reazione qui riportata (Tab. 2.7)

Tab. 2.7 Miscela di reazione con i primers GMKanF/GMKanR

Reagenti	Concentrazione finale
PCR Buffer (10X)	1x
dNTPs (10mM)	20 µM di ciascun nucleotide
MgCl₂ (15mM)	2.5 mM
Primer GMkan F (10mM)	0.1 µM
Primer GMkan R (10mM)	0.1 µM
Taq polimerasi (5U/µl)	2.5 U
DNA genomico	10 ng
Acqua	Per giungere a volume

I cicli termici secondo cui si è svolta la reazione hanno previsto un'iniziale denaturazione a 94°C per 4 min, seguita dalla ripetizione di 35 cicli a 94°C per 1 min, 52°C per 1 min e 72°C per 1 min, e quindi un'estensione finale a 72°C per 10 min.

Il prodotto PCR è stato poi visualizzato mediante corsa elettroforetica orizzontale in gel di agarosio all'1% colorato con una soluzione di bromuro di etidio (10 mg/ml).

Le bande ottenute sono state confrontate con lo standard di pesi molecolari del 1KB plus (Invitrogen). Il gel è stato poi fotografato in seguito ad esposizione ai raggi UV.

PRIMERS *pilT* F/*pilT* R

La presenza del gene *pilT* nei diversi ceppi batterici è stata valutata mediante PCR con i primers *pilT* F ed *pilT* R che sono stati disegnati su una zona molto conservata del gene *pilT* e producono un amplicone di 356bp.

La reazione di PCR è stata eseguita utilizzando il termociclatore MyCycler della BIORAD. L'amplificazione è stata realizzata in un volume finale di 50 µl utilizzando la miscela di reazione qui riportata (Tab. 2.8)

Tab. 2.8 Miscela di reazione con i primers *pilTF/pilTR*

Reagenti	Concentrazione finale
PCR Buffer (10X)	1x
dNTPs (10mM)	20 µM di ciascun nucleotide
MgCl₂ (15mM)	1 mM
Primer <i>pilTF</i>(10mM)	0.15 µM
Primer <i>pilTR</i>(10mM)	0.15 µM
Taq polimerasi (5U/µl)	2.5 U
DNA	10 ng
Acqua	Per giungere a volume

I cicli termici secondo cui si è svolta la reazione hanno previsto un'iniziale denaturazione a 94°C per 4 min, seguita dalla ripetizione di 30 cicli a 94°C per 1 min, 58°C per 1 min e 72°C per 45 sec, e quindi un'estensione finale a 72°C per 10 min.

Il prodotto PCR è stato poi visualizzato mediante corsa elettroforetica orizzontale in gel di agarosio all'1% colorato con una soluzione di bromuro di etidio (10 mg/ml).

Le bande ottenute sono state confrontate con lo standard di pesi molecolari del 1KB plus (Invitrogen). Il gel è stato poi fotografato in seguito ad esposizione ai raggi UV

2.10 MANIPOLAZIONE DEL DNA

ENZIMI E KIT DI CLONAGGIO

Nel corso del lavoro sono stati utilizzati diversi enzimi prodotti dalle ditte Invitrogen, Biolabs e Promega. Per il loro utilizzo sono state seguite le indicazioni fornite dalle rispettive case produttrici

Per gli esperimenti di clonaggio in *Escherichia coli* sono stati utilizzati tre diversi vettori plasmidici pGem-TEasy, pUTmini-Tn5 Km e pBlueScriptSK, (Fig. 2.3-2.4-2.5)

I Kit di clonaggio pGem-TEasy Vector Systems (Promega), pUTmini-Tn5 Km Kit (Biomedal) e pBlueScriptSK Phagemids (Stratagene), sono stati utilizzati seguendo le indicazioni fornite dalle rispettive case produttrici

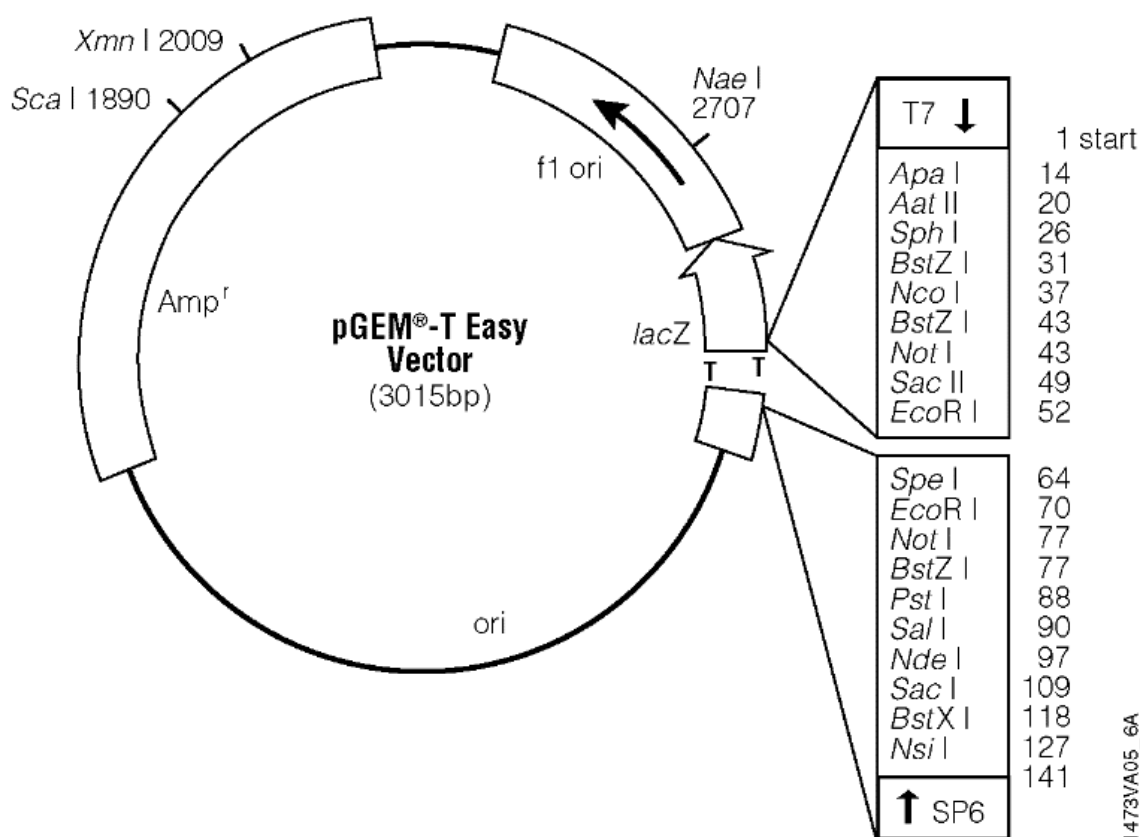


Figura 2.3 : Mappa circolare del vettore pGEM®-T Easy

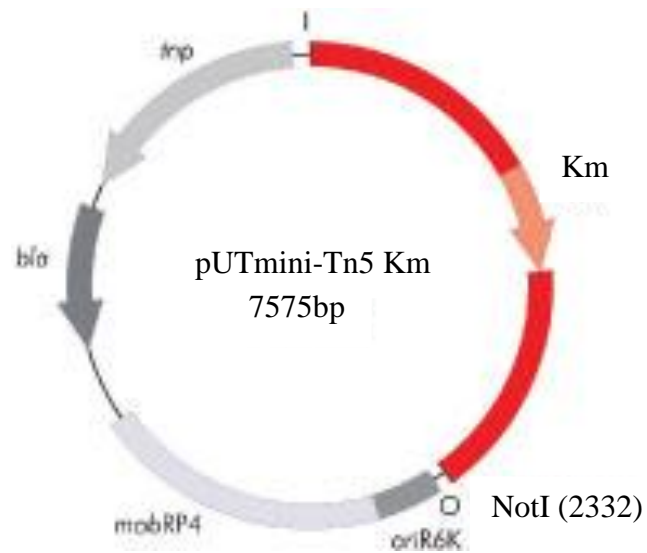


Figura 2.4: Mappa circolare del vettore pUTmini-Tn5 Km

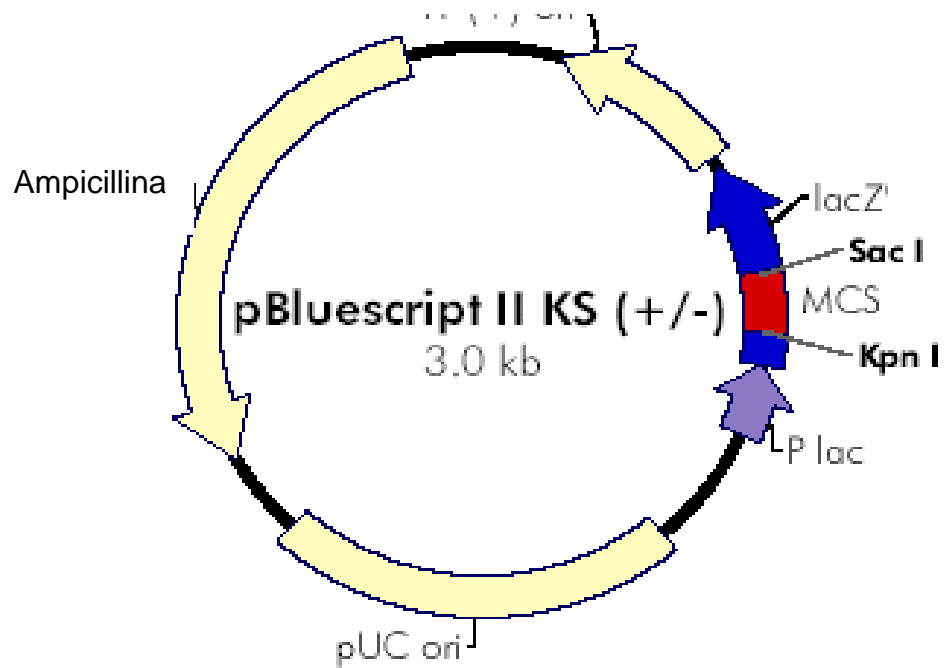


Figura 2.5: Mappa circolare del vettore pBluescript II KS

ELUIZIONE E PURIFICAZIONE PLASMIDI E PRODOTTI PCR DAL GEL DI AGAROSIO

I plasmidi e i prodotti PCR sono stati eluiti dai gel di Agarosio utilizzando il kit QIAEX II (Qiagen) e seguendo il protocollo descritto:

- Tagliare la banda di DNA dal gel di agarosio prelevando la minor quantità possibile di gel
- Aggiungere 3 volumi di Buffer QX1 per ogni 100 mg di gel (frammenti da 100bp-400Kb)
- Risospendere la resina QIAEX II agitando al vortex per 30 sec e aggiungerla al campione secondo la tabella e mixare.

< 2 µg	Aggiungere 10 µl di QIAEXII
2-10 µg	Aggiungere 30 µl di QIAEXII
Per Ogni 10µg	Aggiungere 30 µl di QIAEXII

- Incubare a 50°C per 10 min per solubilizzare l'agarosio e legare il DNA alla resina.
- Mescolare agitando su vortex per almeno 2 min per portare il DNA in sospensione. Il colore della mistura deve essere giallo. [Se il colore è arancione oppure viola, aggiungere 10µl di 3M sodio acetato pH 5. Il colore dovrebbe tornare giallo dopo un'incubazione di 5 min.]
- Centrifugare il campione per 30 sec e rimuovere il supernatante
- Lavare il pellet con 500 µl di buffer QX1
- Lavare il pellet 2 volte con 500 µl di buffer PE
- Asciugare il pellet per 10-15 min o fino a che il pellet non diviene bianco
- Per eluire il DNA aggiungere 20 µl di TE 0 H2O e risospendere il pellet agitando su vortex
- Incubare in accordo con la tabella

Frammento DNA < 4Kb	Incubare a T.A. per 5 min.
Frammento DNA 4-10Kb	Incubare a 50°C per 5 min.
Frammento DNA > 10Kb	Incubare a 50°C per 5 min.

- Centrifugare per 30 sec e recuperare il supernatante che contiene il DNA eluito
- Ripetere gli step 10 e 11

TRASFORMAZIONE ESCHERICHIA COLI DH5 α PIR E S17 λ PIR MEDIANTE TSS

TSS è una soluzione che consente, utilizzando una procedura molto semplice e veloce, di preparare cellule competenti pronte per la trasformazione plasmidica. [Chung *et al.* 1989]. Di seguito è descritta la procedura utilizzata:

Preparazione delle cellule competenti

Pre-coltura: Inoculare una singola colonia del ceppo da trasformare in 3 ml di LB medium con l'antibiotico appropriato e far crescere O/N a 37°C in agitazione (200-225 rpm)

Coltura: Inoculare 20 ml di LB medium con 200 μ l di pre-coltura e far crescere a 37°C in agitazione (200-225 rpm) fino a raggiungere O.D.₆₀₀ 0.2-0.4

- Quando la coltura raggiunge un O.D.₆₀₀ 0.2-0.4, dividerla in tubi per micro centrifuga (1 ml/tubo) e mettere in ghiaccio per 5 min.
- Centrifugare a 12000 rpm per 30 sec.
- Eliminare il supernatante e risospendere delicatamente il pellet in 75 μ l di LB medium freddo. Porre in ghiaccio per 5 min.
- Aggiungere 75 μ l di TSS solution e mescolare gentilmente. Porre in ghiaccio per 5 min.

Procedura di trasformazione

- Aggiungere 10-50 ng di DNA (plasmide) alle cellule competenti ottenute nello step 6. Si raccomanda di utilizzare 5-10 μ l di DNA.
- Miscelare gentilmente e porre la reazione di trasformazione in ghiaccio per 30 min.
- Heat shock: Incubare i tubi in un bagnetto termostato a 42°C per 45 sec. Immediatamente porre i tubi in ghiaccio
- Aggiungere 1 ml di LB medium ad ogni tubo
- Incubare a 37°C per il tempo richiesto per l'espressione della resistenza all'antibiotico (solitamente 60 min.)
- Inseminare le piastre di LB contenenti l'antibiotico specifico per garantire la selezione delle colonie trasformate
- Incubare le piastre per 24h a 37°C

OTTENIMENTO DEL COSMIDE *pLafΔnptII*

Il cosmide “broad host range” *pLafΔnptII*, contenente un omologo deletato e non funzionante del gene *nptII*, è stato ottenuto come mostrato in fig. 2.6

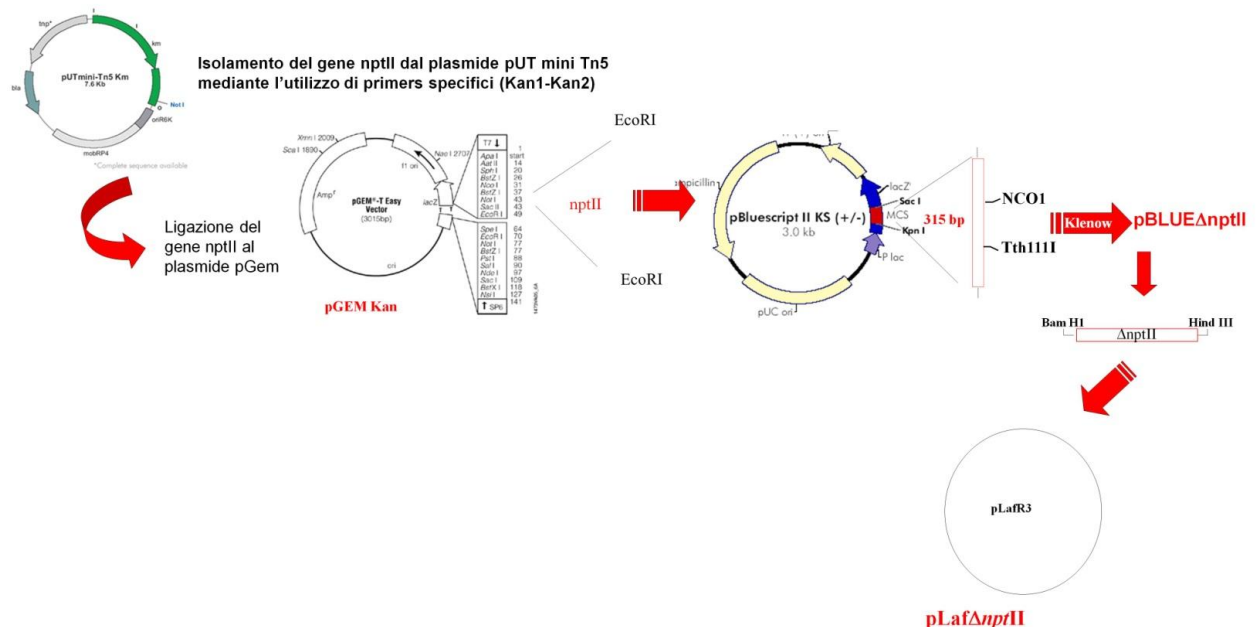


Fig. 2.6 Fasi della costruzione del plasmide “broad host range” *pLafΔnptII*

Il gene *nptII* è stato isolato dal plasmide pUT mini Tn5 [De Lorenzo *et al.* 1990] mediante PCR, utilizzando la coppia di primers Kan1 e Kan2. Il frammento amplificato e purificato, corrispondente all'intero gene *nptII*, è stato clonato nel vettore di clonaggio pGEM-TEasy® e poi trasferito nella specie batterica *Escherichia coli*, mediante TSS, ottenendo il plasmide pGEMnptII. La selezione delle colonie trasformate è stata eseguita con il metodo della distinzione blu-bianco: nel plasmide è infatti presente il gene *lacZ* che codifica per la β-galattosidasi, un enzima che scinde la molecola di X-Gal in due molecole di cui una è di colore blu. L'IPTG agisce sul promotore del gene inducendo la sintesi della β-galattosidasi. Durante il clonaggio il frammento si inserisce nella regione *lacZ* impedendo la sintesi dell'enzima. Le cellule che contengono l'inserito non sono in grado di scindere X-Gal presente nel substrato, quindi saranno di colore bianco; mentre quelle prive dell'inserito metabolizzano X-gal colorandosi di blu. Le colonie bianche sono state prelevate, insemminate in 1 ml di LB liquido contenente ampicillina alla concentrazione di 100 mg/l e lasciate crescere a 37°C per una notte in agitazione.

L'acquisizione del gene *nptII* nelle colonie ottenute è stata verificata nei seguenti modi:

- crescita su substrato contenente kanamicina
- estrazione DNA plasmidico e verifica della dimensione del plasmide su gel di agarosio 0.8%
- PCR con primer Kan 1 e Kan 2 e sequenziamento degli amplificati

Il gene *nptII* è stato a sua volta subclonato in pBlueScript KS(+) in corrispondenza del sito di restrizione di EcoR1, ottenendo così pBbluen*nptII*.

Il plasmide pBluen*nptII* è stato digerito con due diversi enzimi di restrizione (NcoI e Tht11) in modo da introdurre una delezione di 315 bp nella parte centrale del gene *nptII*; dopo la digestione, per ricircularizzare il plasmide è stato necessario integrare dNTPs ai siti di taglio mediante il frammento di Klenow. Questo nuovo plasmide con il gene *nptII* deleto è stato chiamato pBLUE Δ *nptII*.

Cellule di *E.coli* trasformate con pBlue Δ *nptII* non erano più in grado di crescere su substrato contenente Kanamicina indicando che la delezione determinava la perdita di funzionalità del gene.

La dimensione e la sequenza di Δ *nptII* sono stati verificati mediante PCR con i primer Kan1/Kan2 e successivo sequenziamento degli amplificati.

Il gene Δ *nptII* è stato successivamente clonato nel cosmide PlafR3 in corrispondenza dei siti BamH1 /HindIII, consentendo l'ottenimento di pLaf Δ *nptII*, utilizzato per trasformare i ceppi batterici fitopatogeni.

OTTENIMENTO DEL PLASMIDE PAG Δ NPTII

Oltre allo studio che prevede l'utilizzo di plasmidi, si è pensato di ottenere un ceppo di *Pseudomonas corrugata* contenente il gene Δ *nptII* integrato nel proprio genoma e non più come elemento extra-cromosomiale.

A questo scopo, è stato utilizzato il plasmide “suicida” pAG408 (ori R6K) che contiene al suo interno un minitrasposone. Il pAG408 ha la caratteristica di sopravvivere come plasmide solo nei ceppi contenenti il gene λ pir, la cui presenza assicura la replicazione dei plasmidi contenenti RK6 come origine della replicazione. Nei ceppi privi di tale gene il plasmide non sopravvive e il minitrasposone va ad integrarsi a caso nel genoma dell'ospite. [Suarez *et al.*, 1996].

Il plasmide pAG408 è stato modificato prima di essere utilizzato; in particolare sono state eliminate le sequenze dei geni *nptII* e GFP contenute nel mini-trasposone ed è stato clonato

il gene $\Delta nptII$ isolato dal plasmide pBlue $\Delta nptII$ nei siti di restrizione NotI/KpnI (pAG $\Delta nptII$).

Cellule di *E.coli* DH5 α λ pir e S17 λ pir sono state trasformate, mediante l'utilizzo di TSS, con il plasmide precedentemente ottenuto, pAG $\Delta nptII$, e i trasformanti sono stati selezionati su piastre di LB Agar contenenti gentamicina e ampicillina. (Fig. 2.6)

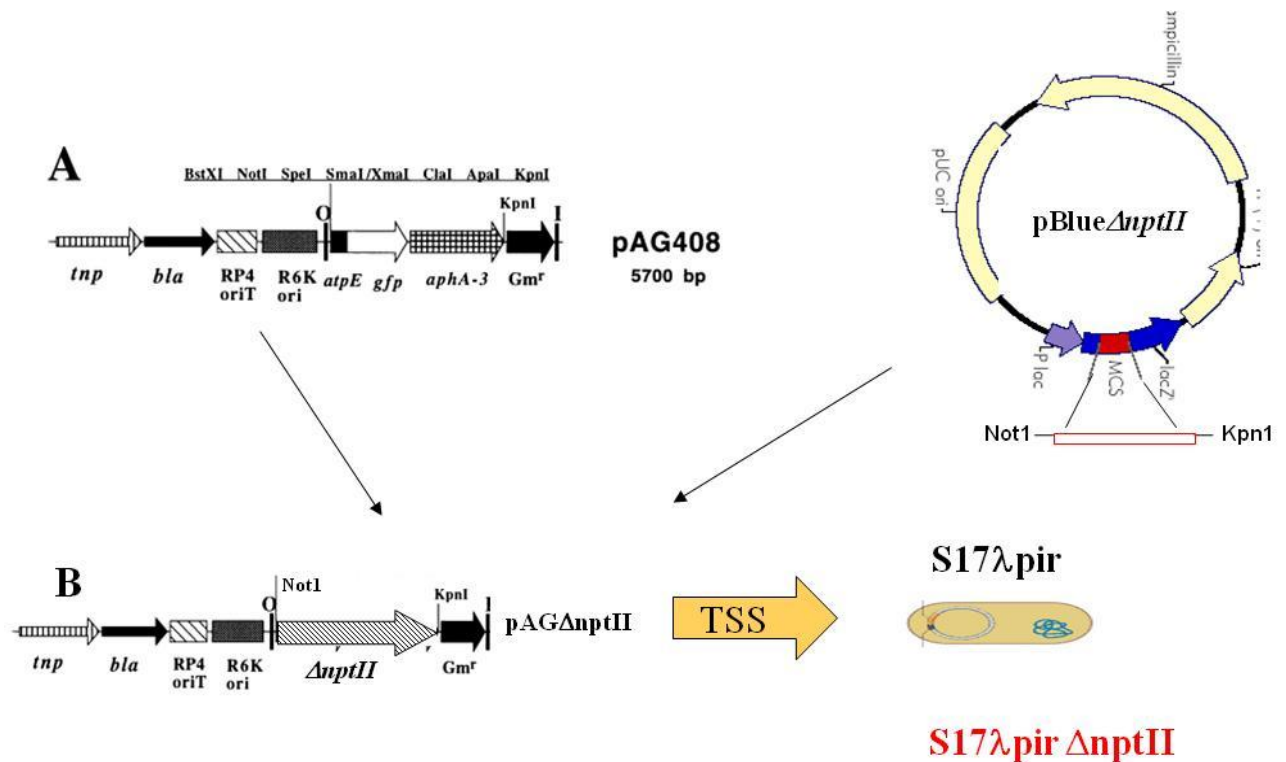


Fig. 2.6. Fasi della costruzione del plasmide pAG $\Delta nptII$

TRASFORMAZIONE DEI BATTERI FITOPATOGENI

Nel momento in cui i plasmidi sono stati trasferiti nei diversi ceppi batterici fitopatogeni, si è eseguita la procedura denominata Triparental Mating, che viene di seguito riportata, per trasformare *P. syringae* pv. *tomato* e *P. corrugata*:

Giorno 1

- Inoculare *E. coli* DH5 α con il vettore e l'inserito che deve essere mobilizzato (ceppo donatore) in 3 ml di LB addizionati con l'antibiotico specifico
- Inoculare 3 ml LB+ Km₅₀ con *E. coli* HB101 (ceppo helper)

- Inoculare 3 ml LB con *P. aureofaciens* 30-84 o suoi ceppi derivati (ceppo ricevente)

I batteri sono stati allevati per 16-18 ore in agitatore termostato alle T° specifiche per le diverse specie.

Giorno 2

- Lasciar asciugare le piastre Petri di LB senza antibiotico sotto cappa a flusso laminare.
- Trasferire sterilmente i filtri di nitrocellulosa sterile sulle piastre
- Trasferire 1 ml di coltura batterica in eppendorf da 1.5 ml e centrifugare per 1 min a 13000 rpm.
- Eliminare il supernatante e risospendere i pellets in 200 µl di LB.
- Inoculare i filtri con 20µl del ceppo donatore, ricevente ed helper come illustrato nella figura 2.7
- Incubare le piastre a 28°C per 24-48 ore

Giorno 3

- Trasferire i filtri di nitrocellulosa in tubi di vetro sterili e contrassegnati con le rispettive sigle.
 - Aggiungere 2 ml di ddH₂O sterile e agitare su vortex per pochi secondi per risospendere le cellule dai filtri.
 - Inseminare 100 µl in piastre di LB agar con il rispettivo antibiotico ed incubare a 28°C.
- La visualizzazione delle prime colonie può richiedere dalle 24 alle 72 ore. Le piastre insemiante con i filtri “Solo Ricevente ” e “Solo Donatore” non devono presentare sviluppo di colonie.

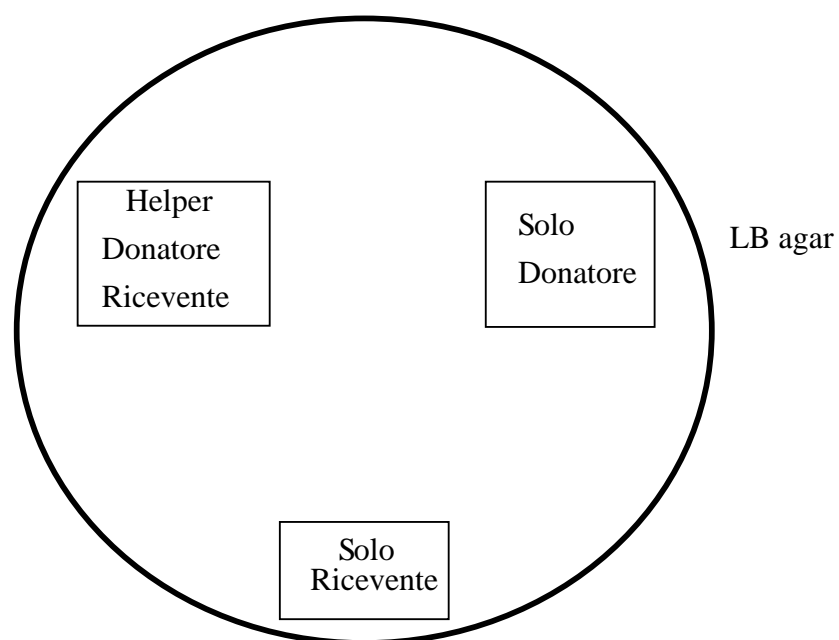


Fig.2.7 Triparental Mating. Disposizione dei filtri su piastra di LB

Quando è stato utilizzato come donatore il ceppo S17 λ pir, non è stato necessario utilizzare il ceppo helper è in questo caso la procedura di trasformazione è stata denominata “biparental mating”

La metodica di “triparental mating” non si è rilevata efficace per la trasformazione di *R. solanacearum*, che è stata quindi trasformata mediante un protocollo di elettroporazione specifico per *R. solanacearum* di seguito descritto [Chapman,1998]:

- Crescita di *R. solanacearum* a 28°C in 2ml di CPG liquido fino a raggiungere una densità batterica a 600nm di 1 (OD₆₀₀=1)
- Centrifugare 13000rpm per 2min.
- Risospendere il pellet batterico in 1ml di ddH₂O e centrifugare 13000 rpm per 1 min
- Ripetere lo step precedente altre 2 volte
- Risospendere il pellet batterico in 100 μ l di ddH₂O
- Aggiungere 0.5 μ g di DNA plasmidico
- Elettroporare le cellule con il Gene Pulser posto a 25 μ F e con intensità di campo pari a 6V/cm
- Risospendere le cellule elettroporate in 1 ml di CPG broth e incubare per 3 ore a 37°C
- Inseminare 100 μ l in piastre di CPG agar con il rispettivo antibiotico ed incubare a 28°C. La visualizzazione delle prime colonie può richiedere dalle 24 alle 72 ore

2.11 VERIFICA DEL TRASFERIMENTO GENICO ORIZZONTALE MEDIANTE TRASFORMAZIONE NATURALE

Questi esperimenti sono stati eseguiti per verificare un’eventuale ricombinazione omologa fra il gene *Δ nptII* presente nei batteri fitopatogeni (chiamati ceppi accettori) e il gene *nptII*. L’avvenuta ricombinazione è stata evidenziata grazie all’acquisizione della resistenza alla Kanamicina da parte dei ceppi “accettori”.

TRASFORMAZIONE IN VITRO MEDIANTE “PLATE TRANSFORMATION”

Ottenimento batteri competenti

Far Crescere O/N una singola colonia del ceppo ricevente in LB liquido con l'appropriato antibiotico (fino ad un O.D.600 di una diluizione 1/10 della coltura pari a 0.2)

Centrifugare a 5200 rpm per 5 min e risospendere il pellet in 2ml di una soluzione di NaCl 0.85%

Centrifugare a 5200 rpm per 2 min. e risospendere il pellet in 5ml di una soluzione di NaCl 0.85% (E' possibile aggiungere 15% glicerolo e ali quotare le cellule competenti)

Trasformazione su filtro con DNA

Prelevare 100 µl di cellule competenti e aggiungere il DNA “donatore”

Porre un filtro di nitrocellulosa su piastre contenenti LB senza selettivo e aggiungere le cellule competenti con il DNA

Incubare a 28°C per 24h

Risospendere il filtro di nitrocellulosa in 4 ml di soluzione salina (0.85% NaCl)

Centrifugare a 7000 rpm per 2 min e risospendere il filtro in 1 ml di NaCl 0.85%

Piastrare 100 µl su piastre contenenti LB con Kanamicina (50 ppm)

Trasformazione su filtro con omogenato di foglie di pomodoro BB e BBS

Congelare le foglie di pomodoro

Omogeneizzare il tessuto con l'uso di un pestello

Utilizzare 100 mg dell'omogenato per trasformare 100 µl di cellule competenti mediante il protocollo di trasformazione su filtro

Trasformazione su filtro con lisato cellulare di batteri tellurici

Inoculare una singola colonia del ceppo “donatore” in 5 ml di LB e incubare O/N alla temperatura appropriata

Centrifugare a 6000 rpm per 10 min

Risospendere il pellet batterico in 1 ml di ddH₂O e centrifugare a 6000 rpm per 5 min

Eliminare il supernatante e risospendere il pellet batterico in 500µl di ddH₂O

Prelevare un'aliquota ed utilizzarla per il calcolo della cfu/ml

Riscaldare la sospensione batterica a 80°C per 15 min. per lisare le cellule

Piastrare un'aliquota di ogni lisato su piastre contenenti LB agarizzato per verificarne la sterilità

Proseguire con il protocollo di trasformazione su filtro descritto in precedenza, utilizzando come donatore 100 µl lisato cellulare contenenti 2×10^8 cellule

Tutte le prove di trasformazione sono state effettuate in triplicato

TRASFORMAZIONE IN VITRO UTILIZZANDO COMPONENTI DEI SISTEMI NATURALI

Questi esperimenti sono stati eseguiti per verificare la possibilità che eventi di HGT in *P. corrugata* possano avvenire anche in situazioni assimilabili a condizioni ambientali naturali. A tale scopo sono stati effettuati i seguenti esperimenti di trasformazione [Ray *et al.* 2005]:

Trasformazione in “Soil Microcosmos”

In questo protocollo è stata utilizzata una miscela di terreno argilloso e sabbia che per semplicità è chiamata semplicemente suolo. Il suolo è stato sottoposto a sterilizzazione in autoclave per 30 min a 122°C prima di essere utilizzato (Fig. 2.8)

Giorno 1

Pesare 1 g di suolo e porre in tubi di polipropilene da 15 ml

Aggiungere 100 µl (contenenti 1×10^8 cellule) del ceppo ricevente risospeso in ddH₂O

Incubare a T.A per 24 h per consentire ai batteri di adeguarsi alla matrice

Giorno 2

Aggiungere 100 µl di una soluzione nutriente (5X M9 con 25X M9 phosphate e 2% lattosio)

Dopo 3-6 h aggiungere 10 µl del DNA “donatore” (Dna purificato/ lisato cellulare a concentrazione variabile)

Incubare a T.A. per 24 h

Giorno 3

Aggiungere 1 ml di 0.1% sodio pirofosfato e miscelare su vortex per risospendere il suolo

Lasciare sedimentare per 3-5 min.

Piastrare su LB agarizzato e LBK_{m50} per determinare rispettivamente il numero dei batteri accettori e quello dei batteri ricombinanti resistenti alla Kanamicina

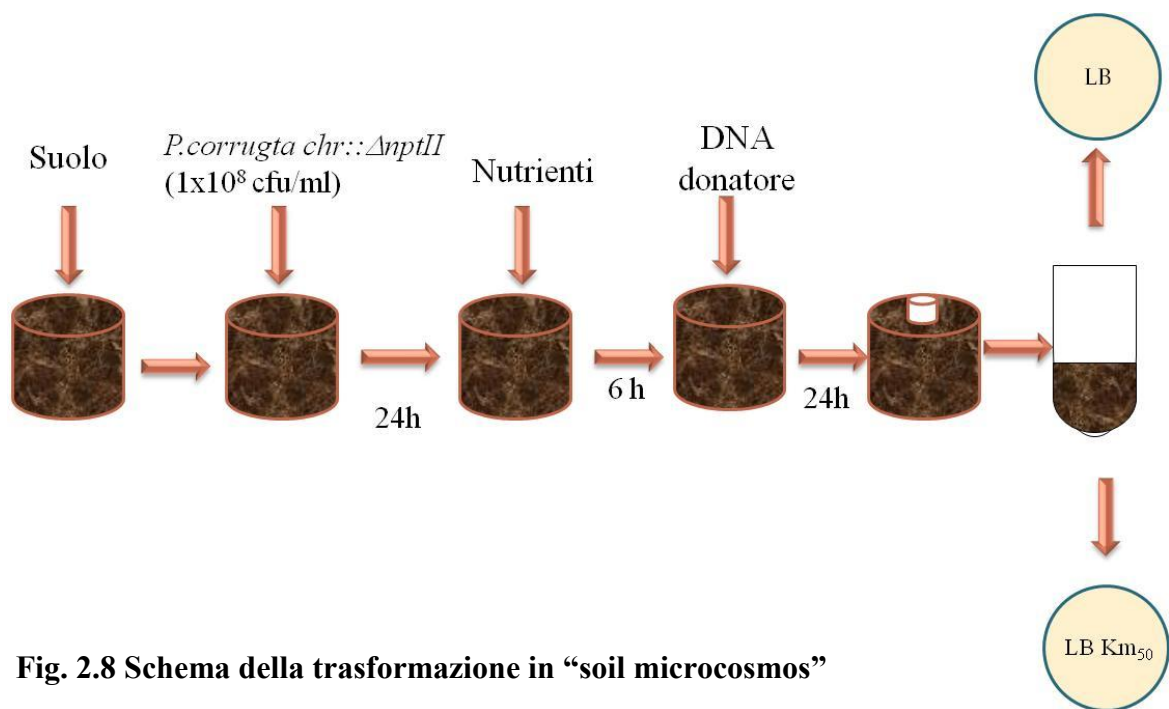


Fig. 2.8 Schema della trasformazione in “soil microcosmos”

Trasformazione in biofilms

In alcuni batteri patogeni umani Gram+, del genere *Streptococcus*, è stato dimostrato che la produzione di biofilm incrementa la possibilità di trasferimento genico orizzontale poiché il biofilm funge da elemento protettivo per le molecole di DNA. [Tormo *et al.* 2005]

Per verificare se anche nei batteri fitopatogeni l'uptake del DNA esogeno possa essere favorito dalla produzione di biofilm, è stato messo a punto il seguente protocollo, che è una versione modificata della procedura descritta da O'Toole *et al.* (1999), che consente il monitoraggio simultaneo della densità batterica, del numero di trasformanti ottenuti, e della quantità di biofilm prodotto (calcolata come quantità di cellule batteriche adese alle pareti dei tubi in polipropilene)

Inoculare tubi eppendorf da 2 ml con 500 µl di AB+Glucosio (0.2%)+Tryptone [0.5%], 5 µl di una coltura overnight del ceppo batterico ricevente e 1 µg di DNA donatore. (Inoculare una quantità di tubi sufficiente per effettuare 10 misurazioni a tempi differenti)
A distanza di 90 min prelevare 100 µl di coltura da piastrare su LBKm₅₀ (conta dei trasformanti) e 100 µl di coltura da utilizzare per calcolare la densità batterica mediante lettura spettrofotometrica [O.D._{600nm}]

Aspirare la sospensione batterica con una pipetta e risciacquare i tubi con 500 µl di ddH₂O.

Aggiungere 750 µl di Cristal Violetto (1%), utilizzato per colorare le cellule batteriche aderenti alle pareti di ogni tubo. [Prestare attenzione nel depositare sul fondo del tubo la soluzione del colorante e cercare di non lasciare tracce di colorante sull'apertura o sul tappo del tubo eppendorf. É uno step delicato che può compromettere la lettura spettrofotometrica]

Lasciar colorare per 15 min a temperatura ambiente

Aspirare con cura il Cristal Violetto con una pipetta

Lavare il tubo eppendorf con 2 ml ddH₂O utilizzando sempre una pipetta,

Aggiungere 2 ml di etanolo (95%) ad ogni tubo per solubilizzare il Cristal Violetto

Quantificare le cellule batteriche aderenti alle pareti dei tubi eppendorf mediante lettura allo spettrofotometro [OD di 600nm].

Ripetere ogni 90 min per 5 volte il primo giorno e per altre 5 il secondo giorno

2.12 TRASFORMAZIONE IN VIVO DI *PSEUDOMONAS CORRUGATA* CON DNA DI POMODORO TRANSGENICO

Per valutare la possibilità di trasferimento genico orizzontale da piante di pomodoro GM al batterio *Pseudomonas corrugata* sono state allestite una serie di prove in camera di crescita. Due set costituiti da 30 piante di pomodoro BB e 30 di BBS sono stati inoculati con una sospensione batterica del ceppo ricevente *P. corrugata chr::ΔnptII* e *P. corrugata pLafΔnptII* (1×10^8 c.f.u./ml) mediante infiltrazione diretta nel midollo.

Le piante dopo circa 20-25 giorni mostravano i sintomi della malattia, in particolare appassimento generalizzato, foglie clorotiche e in seguito a taglio del fusto si trovava il parenchima midollare disfatto, con estese lacune interne e con tipica necrosi asciutta del midollo con presenza di zone cave.

Dopo la visualizzazione dei sintomi, sono stati effettuati isolamenti in laboratorio utilizzando due diversi substrati:

- substrato selettivo contenente rifampicina per determinare la capacità di colonizzazione dei tessuti da parte dei ceppi batterici inoculati.

- substrato selettivo contenente rifampicina e kanamicina per evidenziare l'eventuale presenza di ceppi di *Pseudomonas corrugata* in cui il gene *AnpIII* fosse stato ripristinato dal gene omologo presente in pianta

Gli isolamenti sono stati effettuati periodicamente ogni 14 giorni per circa 5 mesi in modo da visualizzare la progressione della malattia e la comparsa di eventuali trasformanti nel tempo.

2.13 TEST DEL TWITCHING MOTILITY

Questo test è stato eseguito per verificare se il meccanismo utilizzato da *P. corrugata* per catturare il DNA esogeno possa essere simile a quello messo in atto da *P. stutzeri*, in questa specie infatti la capacità di acquisire DNA esogeno è legata alla continua estrazione e ritrazione dei pili, che determina anche questo particolare tipo di movimento flagello-indipendente denominato twitching. Utilizzando il protocollo descritto di seguito, il movimento dei batteri è visualizzato in piastra al di sotto di uno strato di LB agar 1%:

- Inseminare l'isolato batterico da saggiare al centro di una piastra contenente LB1% Agar, in modo da avere una crescita nell'interfaccia substrato/piastra
- Incubare le piastre a 30°C per 8-10 giorni in ambiente umido. (Dopo questa fase è già possibile visualizzare sul fondo piastra un'alone corrispondente al movimento effettuato dal batterio)
- Eliminare il substrato agarizzato dalla piastra
- Colorare il fondo della piastra con Cristal Violetto 1%
- Lasciar colorare per 15 min.
- Risciacquare bene con H₂O

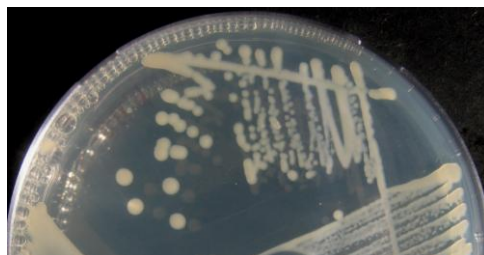
3. RISULTATI

3.1 CARATTERIZZAZIONE DEGLI ISOLATI BATTERICI

I ceppi batterici fitopatogeni di *Pseudomonas syringae* pv.*tomato* e *Pseudomonas corrugata* utilizzati in questo lavoro, sono stati precedentemente isolati presso il laboratorio di Batteriologia del Dipartimento ArBoPaVe da piante di pomodoro infette; mentre il ceppo di *Ralstonia solanacearum* razza 3 biovar 2, isolato da patata, ci è stato fornito dall' ARC-Plant Protection Research Institute, Pretoria, South Africa. I tre ceppi sono conservati presso la collezione del Dipartimento e mantenute in acqua distillata sterile. Le tre specie fitopatogene insieme alle due specie telluriche *Acinetobacter bailyi* e *Pseudomonas stutzeri* sono state caratterizzate dal punto di vista morfologico e nutrizionale.

I ceppi batterici sono stati coltivati in piastre di NAG per rilevare i caratteri morfologici delle colonie che sono stati opportunamente registrati (Fig. 3.1):

- ✓ *Pseudomonas syringae* pv.*tomato* colonie irregolari a margine variamente frastagliato, piatte di colore bianco perlaceo
- ✓ *Pseudomonas corrugata* colonie circolari con superficie increspata, leggermente rilevate, con margini frastagliati, di color giallo crema non fluorescenti su KB
- ✓ *Ralstonia solanacearum* colonie molto mucose e rilevate, margine regolare, colore bianco perlaceo
- ✓ *Acinetobacter bailyi* colonie molto compatte, tonde, a margine netto, di colore bianco
- ✓ *Pseudomonas stutzeri* colonie traslucide piccole, irregolari a margine variamente frastagliato, piatte



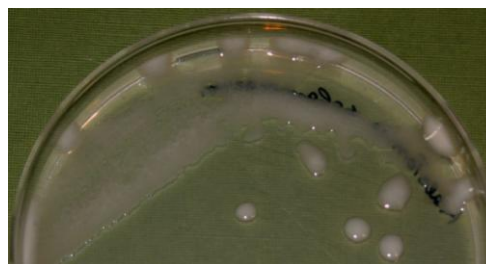
Acinetobacter baileyi



Pseudomonas syringae pv. tomato



Pseudomonas stutzeri



Ralstonia solanacearum



Pseudomonas corrugata

Fig 3.1 Morfologia delle colonie delle specie batteriche utilizzate

Gli isolati, sottoposti al test del KOH per verificare che fossero batteri Gram negativi, sono stati sottoposti al test Biolog™ grazie al quale sono stati ottenuti i profili nutrizionali specifici di tutti i ceppi utilizzati successivamente negli esperimenti di trasformazione. Ad ogni pozzetto della piastra BIOLOG, corrisponde una sostanza specifica; se il batterio è in grado di utilizzare rapidamente la sostanza contenuta nel pozzetto, il lettore di piastre rileverà un valore positivo solitamente superiore a 100, se il batterio è in grado di degradare la sostanza ma in modo non molto efficiente si leggerà un valore positivo inferiore a 100, se invece non è in grado di utilizzare la sostanza, si avrà un valore negativo o pari a 0.

In figura 3.2 è mostrato il profilo metabolico di uno degli isolati batterici utilizzati nel lavoro, che è stato riconosciuto come *P. corrugata* con una probabilità del 99%.

Program	: Biollog MicroLog2 4.20
Read From File	: C:\Biollog420\LUCIA\MIUR biolog\corrugata.D4C
Save To File	: ...
Unrestricted Access?	: Yes
Read Time	: mar 15 2007 11:40
Parent File	: Original Data Record
Plate Number	: 1
Incubation Time	: 16-24
Sample Number	:
Strain Type	: GN-ALL
Strain Number	:
Strain Name	: A.
Other	:
Data Input Mode	: File
590/750 Filters Used	: 6 / 5
Threshold Mode	: Automatic: Color: 69/125
Number +/- Reactions	: 39 / 12 / 45
Database To Search	: MicroLog
Data Base(s) Searched	: C:\Biollog420\Databases\GN601.KID

Key	: <X>: positive; <X>: mismatched positive; X: negative; X+: mismatched negative
	(X): borderline; <X>: less than A1 well

Color	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	4	16	61	{ 00}	< 339>	10	{ 75}	1	< 878>	< 142>	-1
B	-3	< 188>	19	< 196>	0	< 317>	< 147>	2	-3	1	{ 104}	< 207>
C	0	-3	55	11	-7	16	< 186>	< 235>	-9	-8	< 223>	{ 110}
D	57	< 218>	< 299>	< 144>	< 197>	< 220>	< 165>	67	< 232>	30	< 278>	5
E	< 153>	6	13	< 276>	25	< 229>	< 162>	{ 87}	{ 111}	< 314>	6	< 283>
F	< 199>	36	15	67	< 198>	< 173>	< 230>	< 271>	< 239>	< 297>	10	54
G	{ 105}	{ 113}	< 150>	44	13	< 235>	< 144>	15	< 184>	10	{ 83}	< 240>
H	< 260>	< 180>	51	4	2	32	{ 103}	40	{ 105}	{ 98}	3	1

-> Species ID: Pseudomonas corrugata <-			
Species	PROB.	SIM	DIST. TYPE
->1) Pseudomonas corrugata	99	0.72	4.09 GN-NENT OXI+
2) Pseudomonas fluorescens biotype F	1	0.01	5.73 GN-NENT
3) Pseudomonas fluorescens	0	0.00	7.26 GN-NENT
4) Pseudomonas fuscovaginae	0	0.00	7.93 GN-NENT OXI+
5) Pseudomonas marginalis	0	0.00	8.19 GN-NENT OXI+
6) Pseudomonas fluorescens biotype G	0	0.00	8.41 GN-NENT
7) Pseudomonas aurentacea	0	0.00	8.52 GN-NENT OXI+
8) Pseudomonas fluorescens biotype A	0	0.00	8.52 GN-NENT
9) Pseudomonas tolaasii	0	0.00	8.53 GN-NENT OXI+
10) Pseudomonas chlororaphis (fluor. biotype D)	0	0.00	8.59 GN-NENT OXI+

Fig. 3.2 Profilo BIOLOG dell'isolato di *P. corrugata*

3.2 PROVE DI PATOGENICITÀ

Le prove di patogenicità per *P. syringae* pv. *tomato* e *P. corrugata* sono state eseguite in serra e quelle relative a *R. solanacearum* in armadio climatico. Tutte hanno dato tutte esito positivo, le piante di pomodoro inoculate hanno mostrato la sintomatologia specifica e da tutte è stato reisolato il patogeno inizialmente inoculato.

In fig. 3.3 sono visibili i sintomi causati da *P. syringae* pv. *tomato* sulle piante di pomodoro BB; in particolare si notano sulle foglie piccole aree necrotizzate circondate da aloni clorotici che in alcuni casi confluiscono provocando la necrosi di ampie porzioni di lembo. Sui frutti si notano maculature nerastre leggermente in rilievo circondate da un alone idropico.



Fig. 3.3 Sintomi di macchiatura batterica causati da *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* su piante di pomodoro BB

La concentrazione batterica sulle foglie sintomatiche raggiungeva i 2.5×10^8 cfu/g tessuto dopo 12 giorni dall'inoculo.

In fig. 3.4 sono visibili i sintomi causati da *Ralstonia solanacearum*, si nota in particolare l'avvizzimento molto rapido della pianta che nel giro di 12-15 giorni va incontro a morte.

La concentrazione batterica rilevata sui tessuti infetti risultava di circa 2×10^8 cfu/g tessuto dopo 10 giorni dall'inoculo.



Fig. 3.3 Sintomi di avvizzimento batterico causato da *Ralstonia solanacearum* su piante di pomodoro

Tutte le piante di pomodoro BB, sia giovani che in piena fioritura, inoculate con il patogeno *Pseudomonas corrugata*, dopo circa 20 giorni dal trattamento mostravano i sintomi della malattia, in particolare si notava un inizio di appassimento generalizzato e le foglie presentavano lievi clorosi; inoltre dopo taglio del fusto si osservava il parenchima midollare disfatto, con estese lacune interne e tipica necrosi asciutta del midollo con presenza di zone cave. (Fig.3.4)



Fig. 3.4 Sintomi di necrosi del midollo del pomodoro causato da *Pseudomonas corrugata* su piante di pomodoro

Sia le piante più giovani che quelle in fioritura, nonostante fossero sintomatiche e mostrassero una crescita stentata erano comunque in grado di sopravvivere per molti mesi. Gli isolamenti e le conte microbiche sono state effettuati dai fusti delle piante di pomodoro dopo 20, 40 e 100 giorni dall'inoculo; la concentrazione batterica restava praticamente invariata e pari a $1.2-1.8 \times 10^8$ cfu/g tessuto senza differenze apprezzabili tra le piante giovani e quelle in fioritura, dimostrando quindi l'ottima capacità di colonizzazione e persistenza di *P. corrugata* nei tessuti che infetta.

La figura 3.5 mostra la dimensione della lesione midollare causata da *P. corrugata* nell'arco di 100giorni; anche in questo caso non sono state rilevate differenze apprezzabili tra le piante giovani e quelle in fioritura.

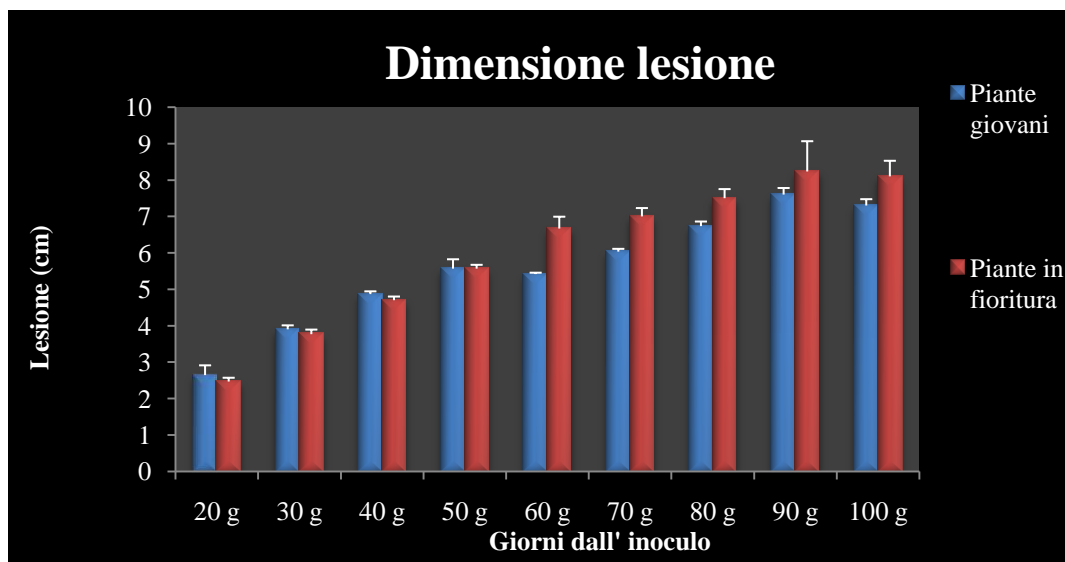


Fig. 3.5 Dimensione in cm dell' area necrotica del midollo di pomodoro, causata da *P. corrugata*

3.3 OTTENIMENTO DEI BATTERI FITOPATOGENI “ACCETTORI” pLAF Δ NPTII

Per facilitare l'integrazione stabile di DNA esogeno all'interno dei ceppi fitopatogeni è stato costruito il cosmide pLAF Δ nptII, contenente un gene *nptII* deletato e non funzionante (Δ nptII) omologo al gene *nptII* presente nelle piante di pomodoro BBS

Il gene *nptII* è stato isolato mediante PCR dal plasmide pUT mini Tn5 ottenendo un amplificato di 1274 bp comprendente anche il promotore del gene stesso (Fig.3.6). Tale gene è stato introdotto inizialmente nel vettore di clonaggio pGEM-TEasy®, che consente il clonaggio diretto dei prodotti di PCR, successivamente è stato clonato nel sito di restrizione *EcoRI* del vettore plasmidico pBlueScript KS

A questo punto il gene *nptII* è stato reso non funzionante tramite una delezione di 315bp effettuata con i due enzimi di restrizione NCOI e Tht11 che non tagliano il plasmide in nessun punto se non nella parte centrale del gene *nptII*

I geni *nptII* e Δ nptII sono stati amplificati mediante PCR con i primer Kan1/Kan2 e gli amplificati purificati sono stati sequenziati per verificare l'effettiva delezione nella parte centrale del gene *nptII*. (Fig 3.7)

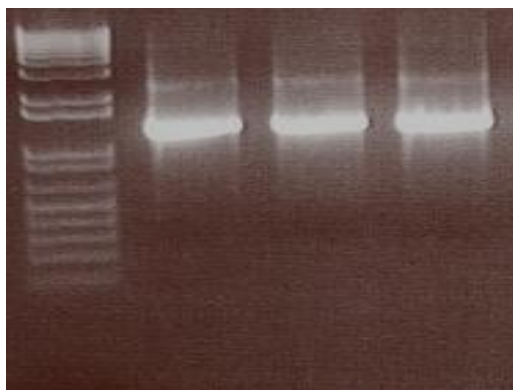


Fig. 3.6 Isolamento del gene *nptII* da pUt mini Tn5 mediante PCR con primers Kan1/Kan2

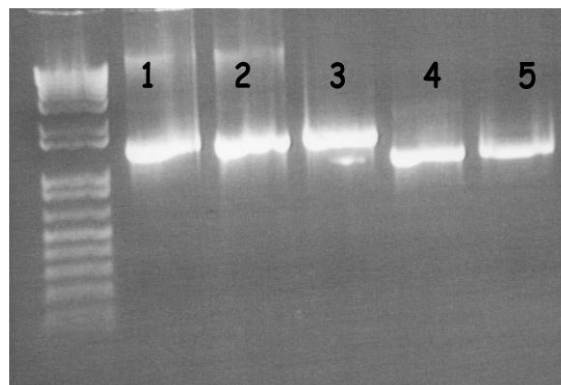


Fig. 3.7 PCR specifica per il gene *nptII/DnptII* con primers Kan1-Kan 2
Linea 1 – 3 gene *nptII*; Linee 4-5 gene *ΔnptII*

il plasmide pBlue Δ *nptII* così ottenuto è stato introdotto in *E.coli* competenti. I trasformanti sono stati selezionati mediante colture su LB+Amp+IPTG+X-GAL, in particolare i batteri trasformati con il plasmide contenente l'inserto hanno formato colonie bianche sul substrato.(Fig 3.8)

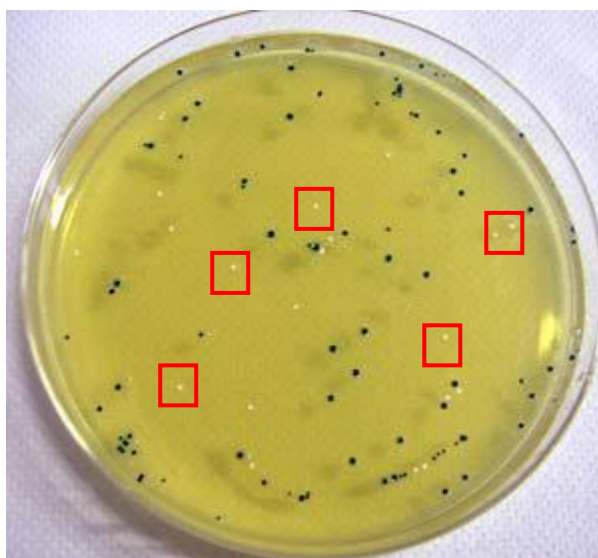


Fig. 3.8. Colonie di *E. coli* DH5 α trasformate con il plasmide pBlue Δ *nptII*. Nei rettangoli rossi sono evidenziate le colonie bianche

Come atteso le colonie bianche avevano perso la capacità di crescere su substrato contenente kanamicina indicando che la delezione determinava la perdita di funzionalità del gene. Il gene *AnptII* è stato successivamente clonato nel cosmide ad ampio spettro di ospiti pLAFR3 in corrispondenza dei siti BamH1/HindIII, consentendo l'ottenimento di pLaf*AnptII*, utilizzato per trasformare i ceppi batterici fitopatogeni. Le specie *P. corrugata* e *P. syringae* pv. *tomato* sono state trasformate con pLAF*AnptII* mediante trasformazione triparentale, tale metodica di trasformazione non si è rilevata efficace per la trasformazione di *R. solanacearum*, che è stata quindi trasformata mediante elettroporazione.

Per confermare l'avvenuta trasformazione, le colonie cresciute sull'opportuno mezzo selettivo, sono state sottoposte ad estrazione di DNA plasmidico e successiva PCR.

La fig.3.9 mostra i risultati dell'estrazione dei plasmidi effettuata su alcune colonie di *P. corrugata* pLAF*AnptII*.

Il Dna plasmidico estratto è stato amplificato con i primer specifici per i geni *nptII*/*AnptII* per verificare l'effettiva presenza del gene d'interesse nei ceppi trasformati.

In figura 3.10 è mostrato il risultato della PCR eseguita con i primers Kan1/kan2 sui ceppi di *P. corrugata* pLAF*AnptII*.

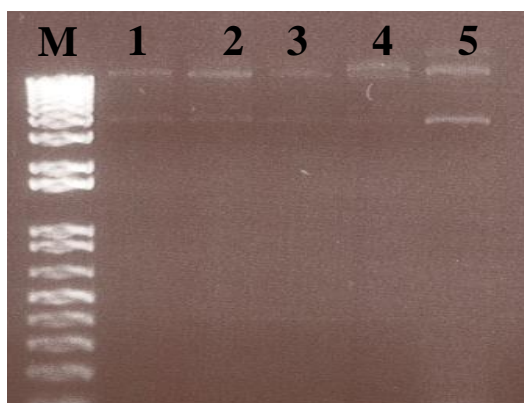


Fig.3.9 Estrazione DNA plasmidico.

Linee 1,2,3,4,5 pLAF*AnptII* estratto da *P. corrugata* trasformata; M=Marker 1KbPlus Invitrogen

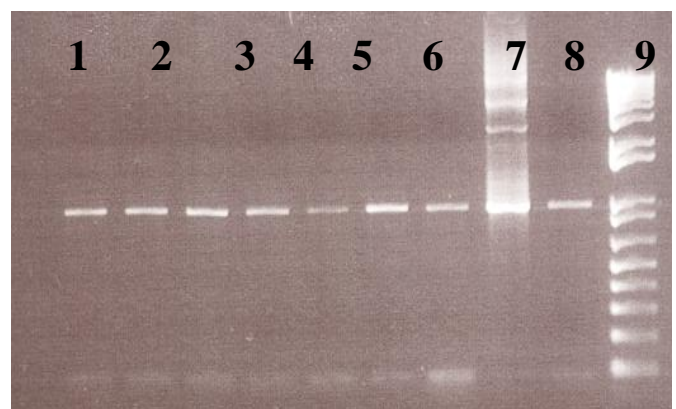


Fig.3.10 Verifica della presenza del gene marcatore *AnptII* nei batteri fitopatogeni. Il gene è stato amplificato mediante PCR con la coppia di primers Kan1/Kan2

Linee 1-9, PCR su Dna plasmidico estratto da batteri fitopatogeni contenenti pLAF*AnptII*. M= Marker 1Kb plus Invitrogen

3.4 IDENTIFICAZIONE DELLA SEQUENZA *NPTII* NEL DNA DELLE PIANTE TRANSGENICHE

La presenza del gene *nptII* nelle piante di pomodoro BBS è stata verificata mediante l'amplificazione, eseguita con la coppia di primers GMKanF/GMkanR di un frammento di circa 350 bp del gene *nptII*.

Tale sequenza risulta assente nelle piante di pomodoro non GM (BB). (Fig. 3.11)

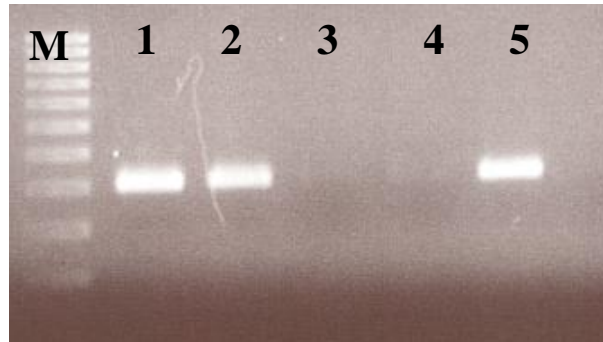


Fig.3.11 Verifica della presenza del gene *nptII* in piante di pomodoro BBS mediante PCR con primers GMKanF-GMKanR
Linee 1,2,5 PCR su Dna genomico estratto da piante di pomodoro BBS
Linea 3,4 PCR su Dna genomico estratto da piante di pomodoro BB
M= Marker 100bp Sigma

3.5 TRASFORMAZIONE IN VITRO DEI CEPPI BATTERICI ACCETTORI

I ceppi patogeni “accettori”, dopo essere stati resi opportunamente competenti, sono stati sottoposti ad esperimenti di trasformazione in piastra con diverse fonti di DNA esogeno contenente il gene *nptII*.

In figura 3.12 è illustrata la nostra ipotesi: i ceppi patogeni contenenti il gene $\Delta nptII$, posti a contatto con il DNA del pomodoro GM contenente il gene *nptII*, potrebbero acquisire tale DNA esogeno e, in seguito ad un evento di ricombinazione omologa ripristinare il gene deleto e quindi acquisire la resistenza all'antibiotico kanamicina.

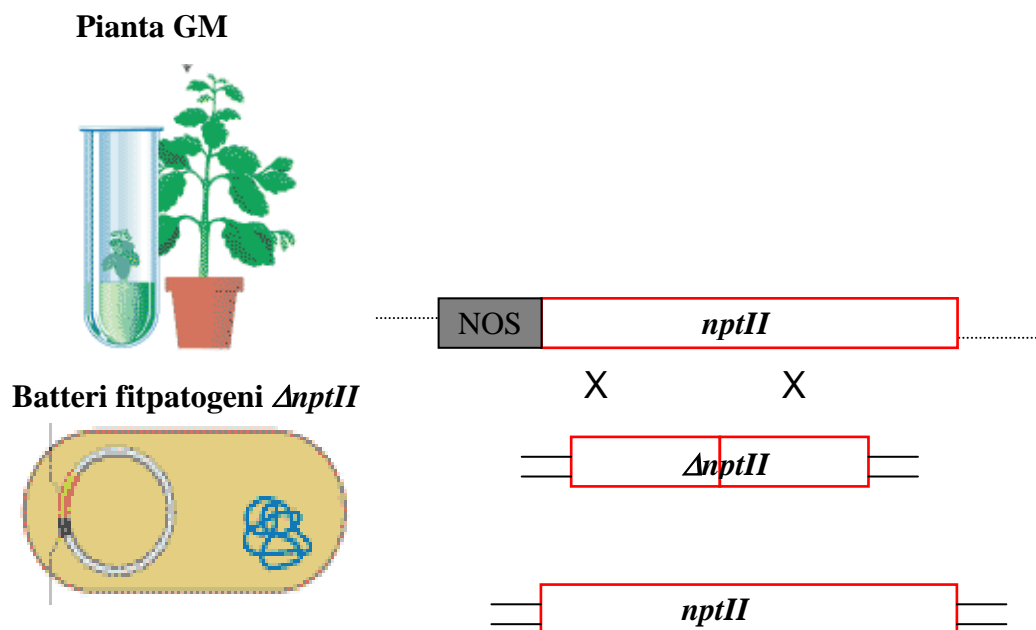


Fig. 3.12 Ipotesi di trasferimento genico orizzontale in seguito a ricombinazione omologa fra DNA “donatore” e DNA “ricevente”

Nella tabella 3.1 sono riportate le frequenze di trasformazione ottenute con i tre ceppi accettori e con varie fonti di DNA “donatore” contenenti il gene *nptII*

I trasformanti sono stati selezionati grazie all’acquisizione della resistenza all’antibiotico kanamicina. Non è stato ottenuto alcun trasformante di *R. solanacearum* kanamicina resistente; probabilmente questo batterio non raggiunge la necessaria competenza alla trasformazione nelle condizioni sperimentali utilizzate. *P. syringae pv.tomato* mostra una frequenza di trasformazione estremamente bassa quando si usa come donatore DNA plasmidico mentre utilizzando DNA vegetale non sono stati ottenuti trasformanti.

P. corrugata, invece, tra i tre è risultato il batterio più facilmente trasformabile in vitro; ciò nonostante la frequenza di trasformazione è apparsa comunque molto bassa soprattutto quando si usa DNA oppure omogenato di pianta transgenica

Tab. 3.1 Frequenza di trasformazione dei tre isolati fitopatogeni

Batteri accettori e DNA trasformante	Antibiotico selettivo	Trasformanti (Cfu/piastra) ^a	Frequenza di trasformazione ^b
Ricevente: <i>P. corrugata</i> pLAF Δ nptII			
PGemnpII (1 μ g)	Tc ²⁵ Kan ²⁵	9x10 ¹	9x10 ⁻⁸
DNA pomodoro BBS 1 μ g	Tc ²⁵ Kan ²⁵	b.d. ^c	<10 ⁻⁹
Omogenato pomodoro BBS 1g	Tc ²⁵ Kan ²⁵	0	0
DNA pomodoro BB 1 μ g	Tc ²⁵ Kan ²⁵	0	0
H ₂ O	Tc ²⁵ Kan ²⁵	0	0
Ricevente: PST pLAF Δ nptII			
PGemnpII (1 μ g)	Rif ⁵⁰ Kan ²⁵	0.3x10 ¹	3x10 ⁻⁹
DNA pomodoro BBS 1 μ g	Rif ⁵⁰ Kan ²⁵	0	0
Omogenato pomodoro BBS 1g	Rif ⁵⁰ Kan ²⁵	0	0
DNA pomodoro BB 1 μ g	Rif ⁵⁰ Kan ²⁵	0	0
H ₂ O	Rif ⁵⁰ Kan ²⁵	0	0
Ricevente: <i>R. solanacearum</i> pLAF Δ nptII			
PGemnpII (100 μ g)	Rif ⁵⁰ Kan ²⁵	0	0
DNA pomodoro BBS 1 μ g	Rif ⁵⁰ Kan ²⁵	0	0
Omogenato pomodoro BBS 1g	Rif ⁵⁰ Kan ²⁵	0	0
DNA pomodoro BB 1 μ g	Rif ⁵⁰ Kan ²⁵	0	0
H ₂ O	Rif ⁵⁰ Kan ²⁵	0	0

^a Valore medio calcolato su tre repliche

^b Calcolata come trasformanti CFU/ accettori (1x10⁹)

^c Below detection

Le colonie di *P. corrugata* e di *P. syringae* pv. *tomato* cresciute su substrato contenente kanamicina sono state prelevate dalle piastre e sottoposte ad analisi molecolare per confermare l'avvenuta ricombinazione tra DNA presente nel batterio e DNA trasformante di origine vegetale e/o plasmidico.

Le colonie sono state sottoposte ad estrazione di DNA plasmidico e successiva PCR con i primers Kan1/Kan2. I risultati della PCR (Fig.3.13) mostrano che nei batteri ricombinanti è presente il gene *nptII* intero che risulta di 315bp più grande rispetto al gene Δ nptII

inizialmente presente nei batteri “accettori”. Alcune colonie trasformate, selezionate a caso, sono state sottoposte ad analisi BIOLOG ed è stato confermato lo stesso pattern metabolico dei ceppi accettori.

Quando negli esperimenti di trasformazione sono stati utilizzati ceppi accettori privi della sequenza *AnptII*, nessun ricombinante kanamicina resistente è stato ottenuto; la presenza di sequenze omologhe nel “ricevente “ e nel DNA “donatore” sembra essere quindi un prerequisito fondamentale per il trasferimento genico orizzontale.

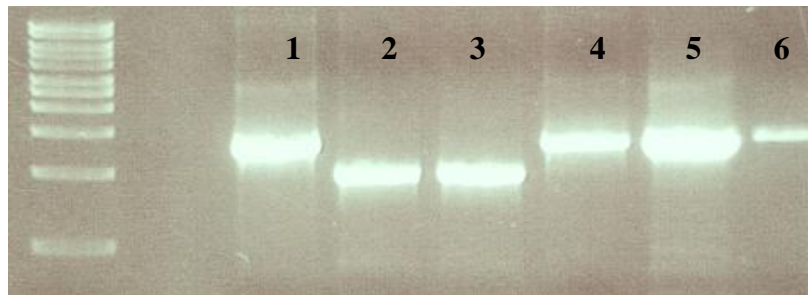


Fig. 3.13 Verifica della presenza del gene ripristinato *nptII* nei batteri fitopatogeni. Il gene è stato amplificato mediante PCR con la coppia di primers Kan1/Kan2

Linea 1- Pcr su Dna plasmidico estratto da *P. syringae* pv. *tomato* pLAFΔ*nptII* ricombinante kanamicina resistente

Linee 4-5-6 Pcr su Dna plasmidico estratto da *P. corrugata* pLAFΔ*nptII* ricombinante kanamicina resistente

Linea 2-3 Pcr su Dna plasmidico estratto da *P. corrugata* pLAFΔ*nptII*

Tale risultato è stato anche confermato dal sequenziamento delle bande amplificate e dal successivo allineamento delle sequenze effettuato mediante il programma bioinformatica gratuito di NCBI bl2seq. Mediante questa analisi bioinformatica è stato verificato il ripristino delle 315 bp inizialmente delete nei patogeni

Sequenziamento prodotti PCR

```
taaaggaagcggaaacacgtagaaagccagtcgcgagaaacgggtgctaccccgatgaatgtcagctactgggctatctggacaa
gggaaaacgcaagcgcaaagagaaagaggtagcttgagtgaggcttacatgacgatagctagactgggcggttttatggacagc
aagcgaaccggaattgccagctggggcgccctctggttaaggttgggaagccctgcaaagtaaactggatggctttcttggcgcca
```

aggatctgatggcgaggggatcaagatctgatcaagagacaggatgaggatcgttcgcattgattgaacaagatggattgcacg
 caggttctccggccgcttgggtggagaggctattcggctatgactgggcacacagacaatcggtgctctgatccgccgtgttc
 cggctgtcagcgcagggcgccccggttcttttgcagaccgacctgtccggtgccctgaatgaactgcaggacgaggcagcg
 cggctatcgtggctggccacgacggcggttccttgcgcagctgtgctcgacgttgcactgaagcgggaagggaaggactggctgctatt
NcoI
 gggcgaagtggcgggcgaggatctcctgtcatctcaccttgctcctgccgagaaaagtatccatcatggctgatgcaatggcgcg
 ctgcatacgttgatccggctacctgccattcgaccaccaagcgaaacatcgcatcgagcgagcacgtactcggatggaagccg
 gtcttgtcagatcaggatgatctggacgaagagcatcaggggctcgcgccagccgaactgttcgccaggctcaaggcgcgcattgc
Tth111I
 ccgacggcgaggatctcgtcgtgacctatggcgatgcctgcttgccgaatatcatggtggaaaatggccgcttttctggattcatcg
 actgtggccggctgggtgtggcgacggctatcaggacatagcgttggctacctgtatattgctgaagagcttggcgcgcaatg
 ggctgaccgcttcctcgtgctttacggtatcgccgctcccgattcgcagcgcacgccttctatgccttcttgacgagttctctgag
 cgggactctggggttcgaaatgaccgaccaagcgacgccaacctgccatcacgagatttcgattccaccgcccgttctatgaa
 aggttgggcttcggaatcgtttccgggacgccggctggatgatcctccagcgcggggatctcatgctggagttcttcg
 (1274bp)

Fig. 3.14 Sequenza del gene *nptII*. in grigio sono evidenziate le 315 bp inizialmente delete ma poi ripristinate nei batteri trasformati

3.6 TRASFORMAZIONE NATURALE DI *PSEUDOMONAS CORRUGATA*

P. corrugata tra le specie batteriche saggiate è quella che ha mostrato maggiore attitudine nell'acquisire ed integrare DNA esogeno, si è quindi pensato di ottenere un ceppo di *P. corrugata* contenente il gene *AnptII* integrato nel proprio genoma piuttosto che presente in elementi plasmidici (*P. corrugata chr::AnptII*). Questa scelta ha consentito in primo luogo di evitare i problemi di perdita del plasmide in caso di crescita in assenza dell'antibiotico selettivo e in secondo luogo ha permesso di verificare l'integrazione stabile di DNA esogeno nel cromosoma batterico e non in un elemento extracromosomiale che potrebbe essere presente in molteplici copie all'interno della cellula batterica.

OTTENIMENTO DI *PSEUDOMONAS CORRUGATA* CHR:: Δ NPTII

Il plasmide pAG408 è stato modificato, come descritto in materiali e metodi, prima di essere utilizzato. In particolare sono state eliminate le sequenze dei geni *nptII* e *GFP* contenute nel mini-trasposone ed è stato clonato il gene *nptII* deleto isolato dal plasmide pBlue Δ nptII mediante taglio con gli E.R. NotI e KpnI (Fig.3.15). Il plasmide pAG Δ nptII è stato mobilizzato in *E.coli* S17 λ pir dove grazie alla presenza della proteina pir, che riconosce l'origine di replicazione R6K, il plasmide viene replicato e la sua presenza è rilevabile grazie alla resistenza all'ampicillina.

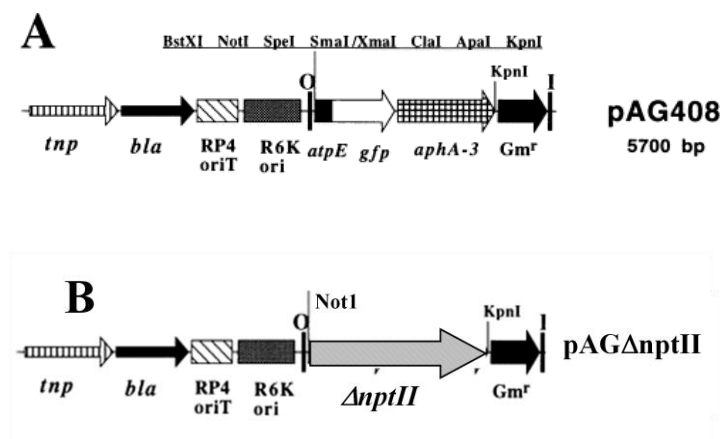


Fig. 3.15 Manipolazione genetica del plasmide pAG408 per l'ottenimento di pAG Δ nptII

Il ceppo S17 λ pir pAG Δ nptII è stato utilizzato come ceppo donatore in esperimenti di coniugazione biparentale al fine di trasferire il plasmide in *P. corrugata*. In questo caso si verifica il “suicidio” del plasmide, a causa dell'assenza della proteina pir, e il minitrasposone va ad integrarsi nel genoma dell'ospite.

La selezione dei trasformanti è stata ottenuta mediante coltura su mezzo contenente LB+Rif₅₀Gent₁₅, grazie alla presenza del gene di resistenza alla gentamicina presente sul minitrasposone. I trasformanti ottenuti sono stati sottoposti ad estrazione di DNA genomico e PCR con i primers kan1/kan2. (Fig. 3.16). La dimensione dell'amplificato e il successivo sequenziamento della banda purificata hanno confermato la presenza del gene *AnptII* nel genoma di *P. corrugata*.

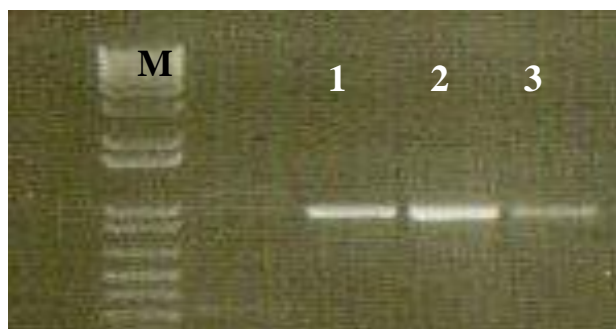


Fig. 3.16 Verifica della presenza del gene *ΔnptII* nei batteri fitopatogeni. Il gene è stato amplificato mediante PCR con la coppia di primers Kan1/Kan2
 Linee 1-3 PCR su DNA genomico estratto da *P. corrugata chr::ΔnptII*
 M=Marker 1Kb plus Invitrogen

TRASFORMAZIONE IN VITRO DI PSEUDOMONAS CORRUGATA CHR::ΔNPTII

P. corrugata chr::ΔnptII è stato utilizzato come ceppo “ricevente” negli esperimenti di trasformazione naturale in vitro utilizzando diverse tipologie di DNA “donatore.

Per chiarire gli effetti dell’incremento della concentrazione di DNA sulla trasformazione naturale di *P. corrugata chr::ΔnptII*, tale ceppo ricevente è stato esposto a concentrazioni crescenti di DNA plasmidico pGem*nptII*.

I trasformanti, che erano in grado di crescere su substrato contenente kanamicina, sono stati sottoposti a tutte le analisi molecolari descritte in precedenza per verificare l’avvenuta ricombinazione omologa.

La fig 3.17 mostra la frequenza di trasformazione, di *P. corrugata chr::ΔnptII* calcolata come N° trasformanti (CFU/piastra)/N°accettori (1×10^8)

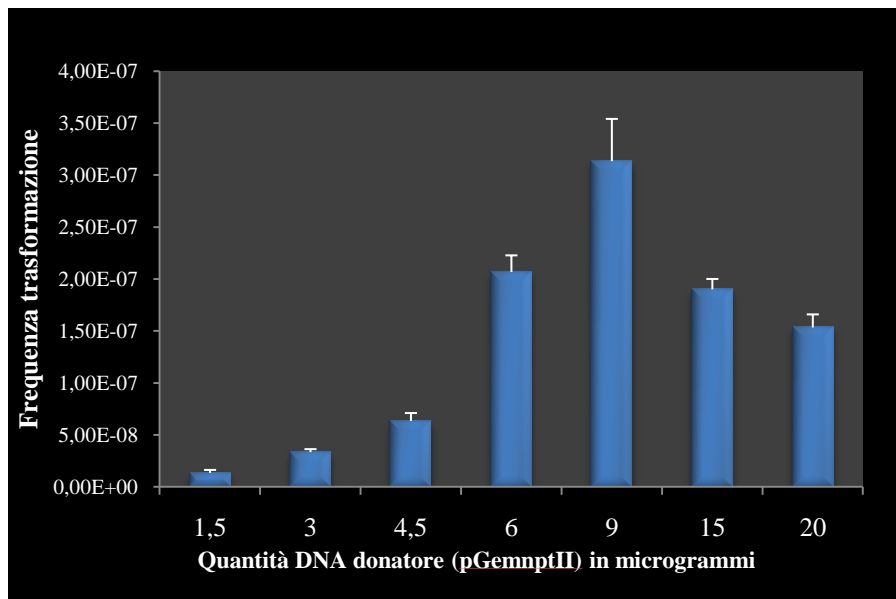


Fig.3.17 Frequenza di trasformazione naturale di *P. corrugata* *chr::ΔnptII* con pGemnptII,

La massima frequenza di trasformazione ottenuta per *P. corrugata chr::ΔnptII* in condizioni ottimizzate è stata di $3,13 \times 10^{-7}$, ottenuta utilizzando 9 μg di DNA plasmidico. Aumentando la concentrazione di DNA “donatore” la frequenza di trasformazione non aumenta ma anzi tende a diminuire; probabilmente l’eccesso di DNA può fungere da ingombro e limitare l’efficienza dell’acquisizione di DNA dall’esterno.

La frequenza di trasformazione di *P. corrugata chr::ΔnptII* è stata confrontata con quella dei batteri tellurici *Acinetobacter baylyi* e *Pseudomonas stutzeri*, che rappresentano due specie modello per gli studi del trasferimento orizzontale di geni in natura.

La frequenza di trasformazione appare molto più alta per le due specie telluriche. In particolare, *A. baylyi* mostra una frequenza massima di trasformazione di $1,35 \times 10^{-5}$, che è circa mille volte più alta di quella di *P. corrugata*, risultando essere una specie con un’elevata attitudine all’acquisizione di DNA esogeno anche se presente a basse concentrazioni.

P. corrugata invece, per essere trasformata, richiede quantità di DNA disponibile molto più consistenti e comunque l’efficienza di trasformazione risulta essere estremamente bassa

P. stutzeri mostra una frequenza di trasformazione intermedia fra le due anche se a differenza delle altre due specie raggiunge la massima efficienza di trasformazione con 15 μg di DNA plasmidico. (Fig. 3.18)

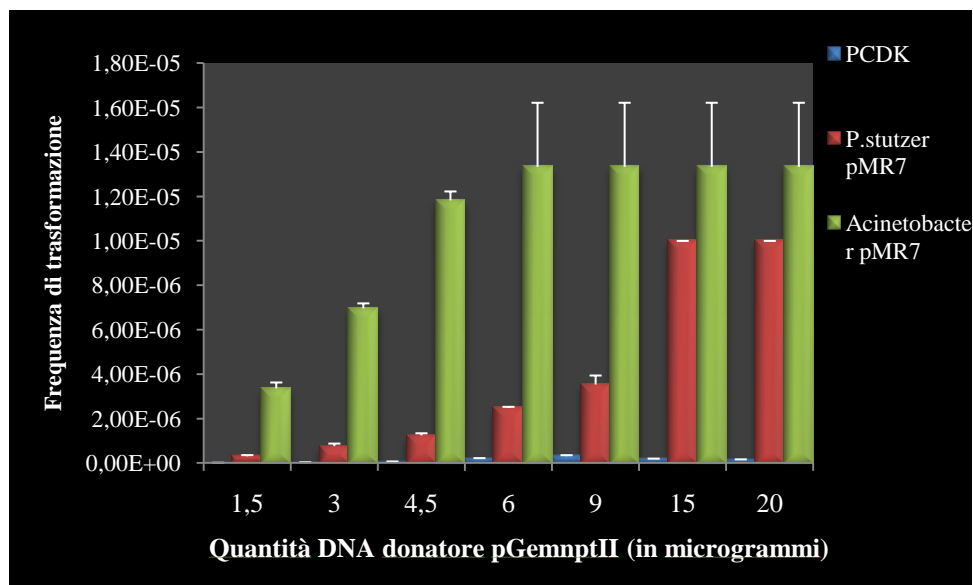


Fig. 3.18 Frequenza di trasformazione di *P. corrugata* *chr::ΔnptII*, *Acinetobacter* pMR7 e *P. stutzeri* pMR7 calcolata come N°trasformanti/N°accettori (1×10^8 cfu/ml)

P. corrugata è una specie batterica in grado di sopravvivere per molti mesi sia nel terreno sia nelle piante che infetta. Questa lunga sopravvivenza unita al fatto che il DNA vegetale rilasciato durante la degradazione dei tessuti può persistere in uno "status" biologicamente attivo per un lungo periodo di tempo [Widmere *et al.* 1996] rende questa specie suscettibile di acquisire DNA esogeno proveniente da pianta o da residui di vegetazione transgenici. Un'altra interessante fonte di DNA esogeno "donatore" potrebbe provenire dai lisati cellulari di specie batteriche telluriche, nei quali il DNA può aderire a residui di polisaccaridi, proteine e residui di membrana, essere protetto dalla degradazione ed essere disponibile per l'acquisizione da parte di altri batteri.

Per verificare le possibilità sopra descritte, il ceppo "ricevente" *P. corrugata* *chr::ΔnptII* è stato trasformato mediante la tecnica della "plate transformation" con DNA, con omogenato di tessuto di vegetale e con lisato di batteri tellurici, tutti contenenti il gene *nptII*.

La figura 3.19 mostra la frequenza di trasformazione, calcolata come N°di trasformanti/N°accettori (1×10^8 cfu/ml) di *P. corrugata* *chr::ΔnptII*.

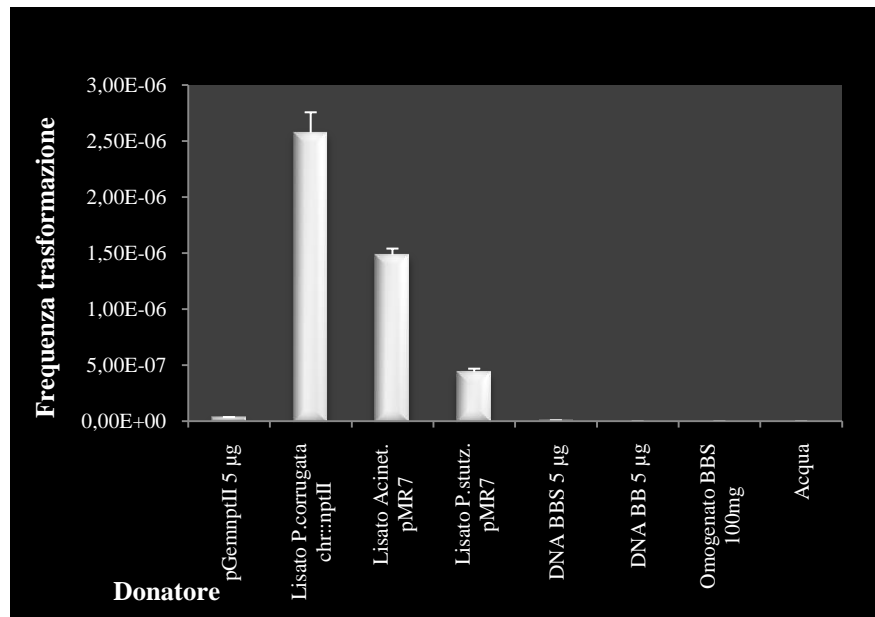


Fig. 3.18 Frequenza di trasformazione di *P. corrugata* *chr::ΔnptII* utilizzando diverse fonti di DNA “donatore”, calcolata come N°trasformanti (cfu/piastra)/N°accettori (1×10^8 cfu/ml)

I dati dimostrano che l'efficienza di trasformazione di *P. corrugata* ottenuta in vitro con i lisati cellulari di diverse specie batteriche tutte contenenti il gene *nptII*, è risultata superiore a quella ottenuta con il DNA plasmidico purificato. Quando invece il ceppo *P. corrugata* *chr::ΔnptII* è stato trasformato con DNA da pomodoro transgenico BBS, sono state ottenute pochissime colonie trasformate e solo utilizzando quantità di DNA vegetale molto elevate (20-30µg). La trasformazione con l'omogenato di pianta BBS, in nessun caso ha determinato la comparsa di colonie di *P. corrugata* ricombinanti kanamicina resistenti. In tutte queste prove di trasformazione, utilizzando ceppi accettori privi della sequenza *ΔnptII*, non è stato ottenuto alcun ricombinante kanamicina resistente .

TRASFORMAZIONE IN VITRO DI PSEUDOMONAS CORRUGATA CHR::ΔNPTII UTILIZZANDO COMPONENTI DEI SISTEMI NATURALI

Una volta verificata la possibilità di *P. corrugata* di essere trasformata in vitro da diverse tipologie di DNA donatore, si è voluta verificare la possibilità che tale specie batterica possa essere trasformata in ambienti che simulino gli ambienti naturali.

Una prima prova è stata eseguita per verificare la possibilità di trasformare *P. corrugata* in un microcosmo di suolo. Il suolo sembra rappresentare un luogo ideale per il trasferimento genico orizzontale, considerato che sono proprio le particelle di suolo, a cui il DNA si lega fortemente, a proteggerlo da una rapida degradazione. [Bertolla *et al.* 1999^b]

Nel suolo inoltre, soprattutto nella rizosfera, sono presenti una quantità enorme di nutrienti che potrebbero stimolare la trasformazione naturale dei batteri. [Watson and Carter 2008]

Tali prove sono state effettuate anche con le due specie telluriche *A. bailiy* e *P. stutzeri*, che però si moltiplicano poco nel suolo sterile e in queste condizioni la trasformazione avviene con maggiore difficoltà. [Ray and Nielsen 2005] Per questa ragione è stata aggiunta al microcosmo di suolo una soluzione nutritiva a base di sali minerali e lattosio che stimola la crescita batterica favorendo lo sviluppo della competenza alla trasformazione che avviene con la massima frequenza proprio durante la fase attiva di crescita. [Nielsen^b *et al.* 1997]

Inizialmente è stata verificata la capacità di colonizzare il microcosmo di suolo da parte dei batteri seguendo lo sviluppo mediante conte microbiche. Come si può osservare dal grafico in fig 3.19, *P. corrugata* è risultata la specie in grado di colonizzare meglio il tipo di suolo utilizzato: infatti la popolazione del batterio aumenta di ben due ordini di grandezza dopo 54 ore di incubazione mentre la concentrazione di *A. bailiy* e *P. stutzeri* aumenta di poco rispetto all'inoculo iniziale.

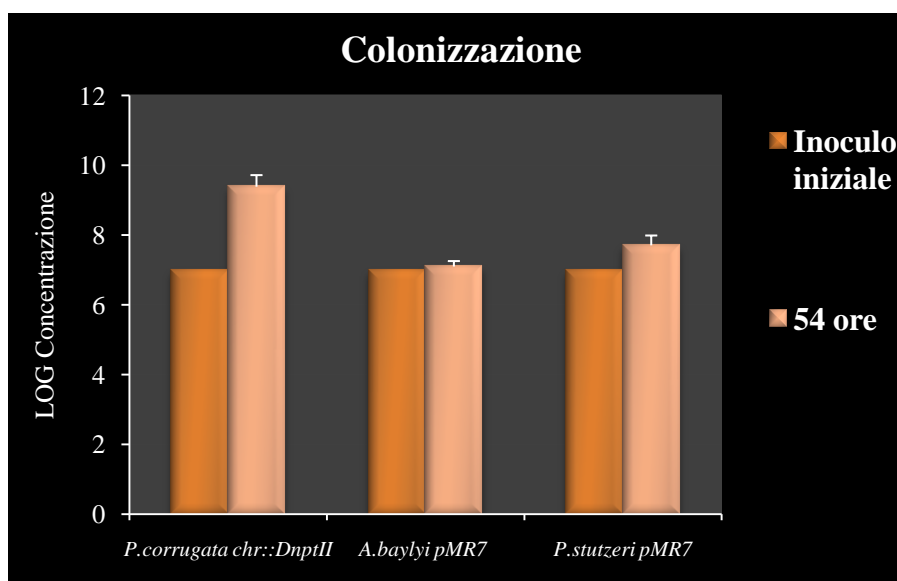


Fig. 3.19 Colonizzazione del microcosmo di suolo da parte di *P. corrugata*, *A. bailii* e *P. stutzeri*

La migliore capacità di colonizzazione del microcosmo di suolo di *P. corrugata*, non è però collegata ad una miglior capacità di trasformazione naturale; aggiungendo infatti al suolo sia DNA plasmidico pGemDnptII (2.5µg), sia lisato cellulare batterico contenenti il gene *nptII* in nessun caso sono state isolate colonie di *P. corrugata* kanamicina resistenti. Nelle condizioni saggiate quindi la specie *P. corrugata* non è in grado di sviluppare la necessaria competenza per la trasformazione naturale.

In tabella 3.2 sono invece mostrate le frequenze di trasformazione ottenute per *A. bailii* e *P. stutzeri*. *A. bailii* risulta, come già visto anche negli esperimenti di trasformazione in piastra, la specie più facilmente trasformabile raggiungendo una frequenza di trasformazione pari a 9.3×10^{-5} quando si utilizza omogenato batterico di *P. corrugata* chr::nptII. *P. stutzeri* invece, raggiunge la frequenza massima di trasformazione pari a $1,35 \times 10^{-6}$, quando è trasformata con DNA plasmidico.

Tab. 3.2 Frequenza di trasformazione in microcosmo di suolo

	Frequenza di trasformazione (N° trasformanti/N° riceventi) in microcosmo di suolo				
Batteri riceventi	DNA donatore				
	PGemnptII	Omogenato P. corrugata chr::nptII	Omogenato A. bailiy	Omogenato P. stutzeri	Acqua
P. corrugata chr::DnptII	o	o	o	o	o
P. stutzeri pMR7	1,35E-06	1,21E-07	3,37E-07	8,53E-07	o
A. Bailiy pMR7	4,19E-06	9,30E-05	8,95E-05	3,41E-05	o

TRASFORMAZIONE IN BIOFILMS

L'incremento del trasferimento genico orizzontale in alcuni batteri Gram positivi del genere *Streptococcus* è stata associata alla produzione di biofilm, in virtù della protezione dalla degradazione che il biofilm attuerebbe nei confronti delle molecole di DNA.[Li *et al.* 2001] Dal momento che *P. corrugata* è una specie batterica in grado di produrre biofilm [Catara *et al.* 2007], si è voluto verificare se anche in questa specie la produzione di biofilm potesse essere associata ad un incremento della frequenza di trasformazione.

Per verificare se il nostro ceppo di *P. corrugata* fosse in grado di formare biofilm, è stato determinata la capacità delle cellule di *P. corrugata* di aderire alla superficie di tubi eppendorf di polipropilene (fig. 3.20A) [Hamon and Lazazzera 2001]. A tale scopo è stato messo a punto un protocollo, , che consente il monitoraggio simultaneo della densità batterica, del numero di trasformanti ottenuti, e della quantità di biofilm prodotto, utilizzando un substrato specifico per favorire la produzione di biofilm e aggiungendo al substrato 1µg di pGemnptII come fonte di DNA esogeno “donatore”.

Il grafico in fig 3.20B mostra l'incremento della concentrazione batterica di *P. corrugata* chr::ΔnptII e della produzione di biofilm, monitorati in un periodo di 30 ore con una misura dei parametri effettuata ogni 1,5 h. Il ceppo batterico produce sicuramente biofilm e la quantità prodotta raggiunge il picco massimo dopo circa 28 ore di incubazione, poi tende

a diminuire rapidamente a causa dell'impossibilità di continuare a crescere e produrre biofilm in un ambiente ristretto come quello costituito da un tubo eppendorf.

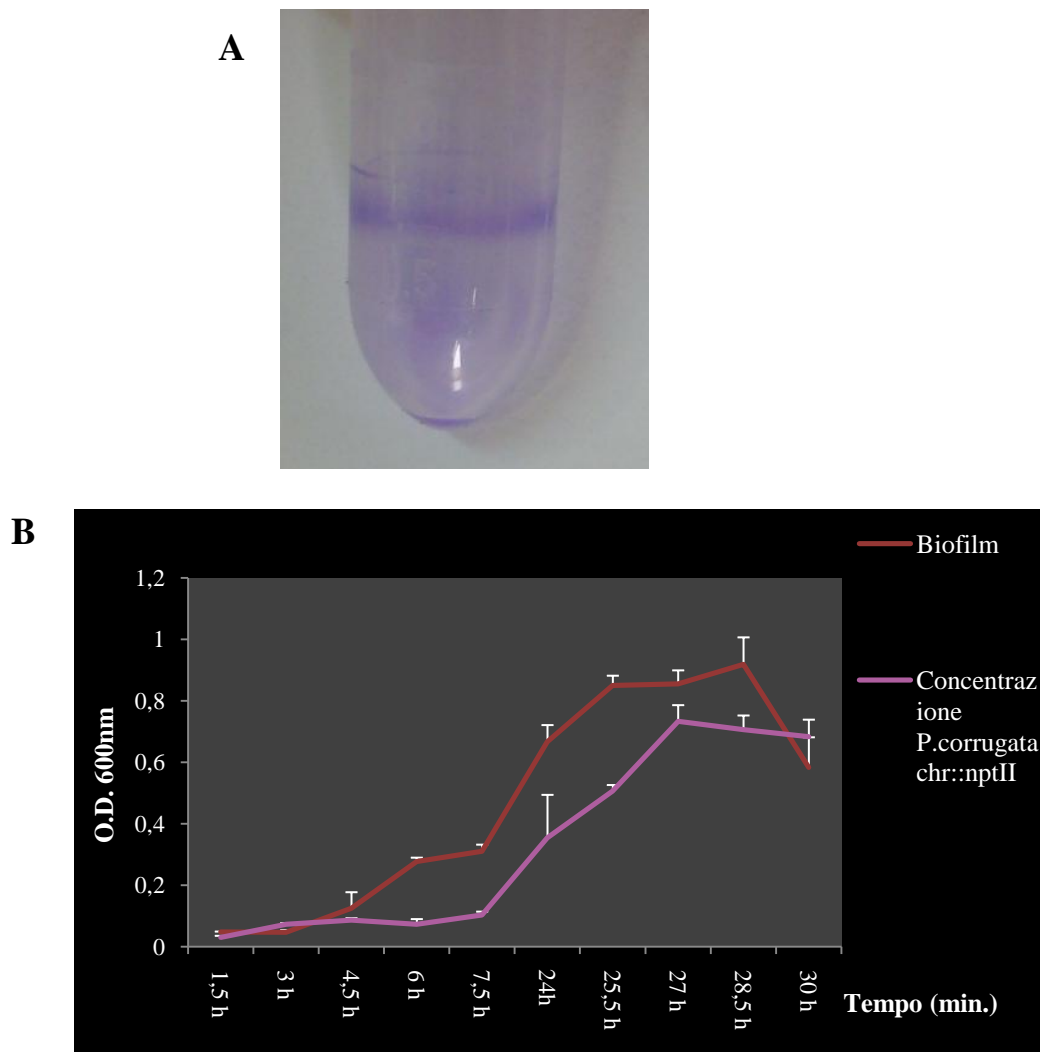


Fig.3.20 Saggio in piastra per verificare la produzione di biofilm da parte di *P. corrugata* chr::AnptII

A. Foto del tubo eppendorf dopo la colorazione delle cellule adese al bifilm con crystal violetto

B. Misura nel tempo dello sviluppo batterico e dell' OD₆₀₀ del crystal violetto solubilizzato dai tubi di polipropilene. Ogni punto del grafico corrisponde alla media di tre tubi.

In tutti gli intervalli di tempo considerati, è stata anche verificata la comparsa di isolati di *P. corrugata* ricombinanti kanamicina resistenti. In nessun momento sono state rilevate colonie trasformate kanamicina resistenti e in questo caso, quindi, la produzione di biofilm non ha favorito l'uptake di DNA esogeno da parte del batterio.

3.7 TRASFORMAZIONE IN VIVO DI *PSEUDOMONAS CORRUGATA* INOCULATA IN PIANTE DI POMODORO TRANSGENICO

Due set costituiti da 30 piante di pomodoro BB e 30 di BBS sono stati inoculati con una sospensione batterica dei ceppi accettori *P. corrugata chr::ΔnptII* e *P. corrugata pLafΔnptII* entrambi ad una concentrazione di 1×10^8 c.f.u./ml.

Dopo circa 20 giorni le piante mostravano i sintomi tipici della malattia quali appassimento generalizzato, foglie clorotiche, parenchima midollare disfatto con estese lacune interne e tipica necrosi asciutta del midollo con presenza di zone cave.

L'ipotesi formulata è che le cellule batteriche possano sviluppare, naturalmente, uno stato di competenza e acquisire ed integrare il DNA esogeno rilasciato dalle cellule vegetali danneggiate dal patogeno.

Per verificare tale possibilità, sono stati effettuati isolamenti in laboratorio utilizzando come substrati LBRif₅₀, per determinare la capacità di colonizzazione dei tessuti da parte dei batteri, e LBRif₅₀Kan₂₅, per evidenziare l'eventuale presenza di ceppi di *Pseudomonas corrugata* in cui il gene $\Delta nptII$ sia stato ripristinato dal gene omologo presente in pianta.

I primi isolamenti sono stati effettuati dopo 24 giorni dall'inoculo del patogeno e gli stessi sono stati ripetuti periodicamente ogni 14 giorni per un periodo di circa 5 mesi; questo è stato possibile perché le piante anche se in modo stentato riuscivano a sopravvivere per tutti questi mesi.

Gli isolamenti e le conte microbiche sono state effettuate dai fusti delle piante inoculate con *P. corrugata chr::ΔnptII* e con *P. corrugata pLafΔnptII*; in figura 3.21 sono mostrati i risultati delle conte microbiche effettuate nell'arco di 136 giorni dalle piante BB e BBS inoculate con *P. corrugata chr::ΔnptII*. I risultati ottenuti con l'inoculo di *P. corrugata pLafΔnptII*, sono praticamente sovrapponibili (dati non mostrati)

La concentrazione di patogeno all'interno della pianta è rimasta praticamente costante nell'arco di tempo considerato e non si sono notate differenze di comportamento tra la cultivar tradizionale (BB) e quella transgenica (BBS). Il ceppo patogeno raggiunge una concentrazione massima nella pianta di $1,3 \times 10^9$ cfu/g tessuto

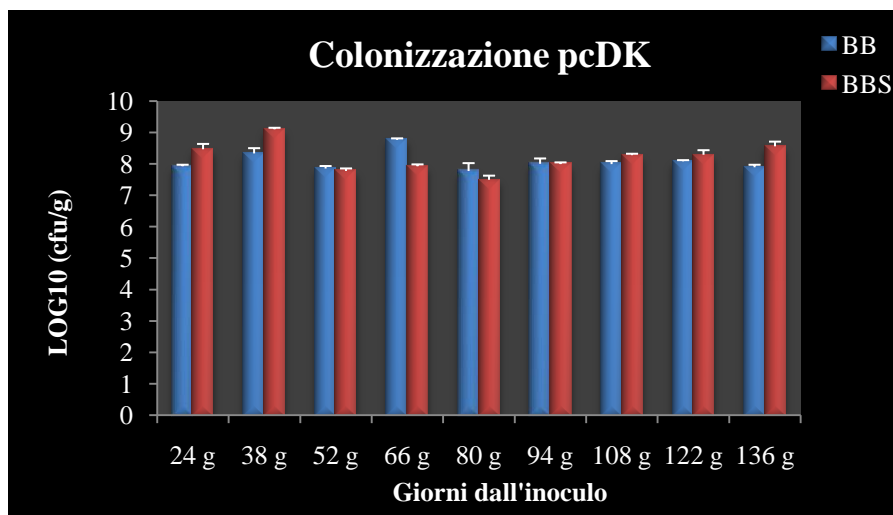


Fig. 3.21 Colonizzazione delle piante di pomodoro da parte di *P. corrugata chr::ΔnptII*

Nonostante la capacità del patogeno di colonizzare i tessuti midollari e di sopravvivere per un periodo così lungo, restando per molto tempo a contatto con i tessuti in via di disfacimento e con cellule vegetali lisate, nessun ricombinante kanamicina resistente è stato mai isolato né dalle piante inoculate con *P. corrugata chr::ΔnptII* né da quelle inoculate con *P. corrugata pLafΔnptII*.

Durante l'interazione in vivo pianta-patogeno, almeno nelle condizioni realizzate durante i saggi, il fenomeno del trasferimento genico orizzontale per la specie batterica da noi considerata non si è verificato

3.8 VERIFICA DELLA PRESENZA DEL GENE *pilT* MEDIANTE PCR IN *PSEUDOMONAS CORRUGATA* E TEST DEL TWITCHING MOTILITY

Il gene *pilT* identificato in *P. stutzeri* determina la capacità del batterio di ritrarre ed estrarre continuamente i pili. Questo meccanismo oltre a determinare un particolare tipo di movimento del batterio noto con il nome di “twitching”, è strettamente legato anche alla capacità di catturare DNA esogeno. Mutanti di *P. stutzeri* privi del gene *pilT* perdono sia la capacità di movimento twitching, sia la capacità di catturare DNA esogeno. Ortologi del gene *pilT* sono stati ritrovati in molti batteri Gram negativi. [Graupner et al. 2001]

L'analisi PCR è stata eseguita per verificare la presenza del gene *pilT* in *P. corrugata*; a tale scopo, grazie al programma bioinformatica NCBI BLAST, è stata individuata una regione di tale gene molto conservata, e proprio in tale regione sono stati disegnati dei primers specifici che producono un amplicone di 356 bp. L'analisi PCR, mostra che la banda specifica è presente solo in *P. stutzeri*, mentre manca sia in *P. corrugata* sia in *A. bailiy* (Fig.3.22)

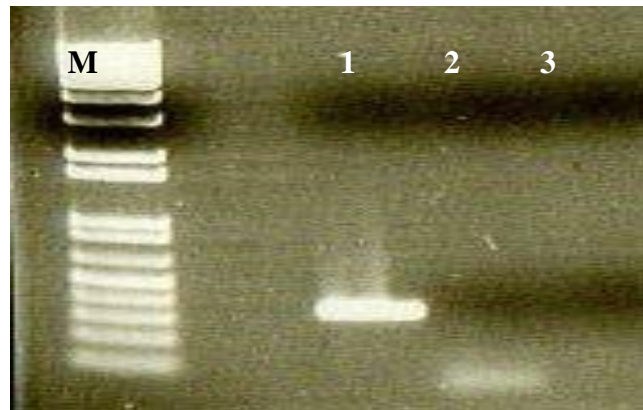


Fig. 3.22 Verifica della presenza del gene *pilT* mediante PCR con primers pilTF-pilTR

Linea 1: PCR su DNA genomico estratto da *P.stutzeri*

Linea 2: PCR su DNA genomico estratto da *P. corrugata chr::DnptII*

Linea 3: PCR su DNA genomico estratto da *A. bailiy*

M=Marker 100bp sigma

Il test della motilità twitching è stato eseguito per verificare se *P. corrugata*, fosse comunque in grado di compiere questo particolare tipo di movimento indipendentemente dalla presenza del gene *pilT*

In fig 3.23 è possibile osservare il movimento twitching, che avviene al di sotto dello strato di LB agar 1%. Il movimento dei batteri è stato evidenziato dalla colorazione del fondo della piastra con una soluzione di cristal violetto.

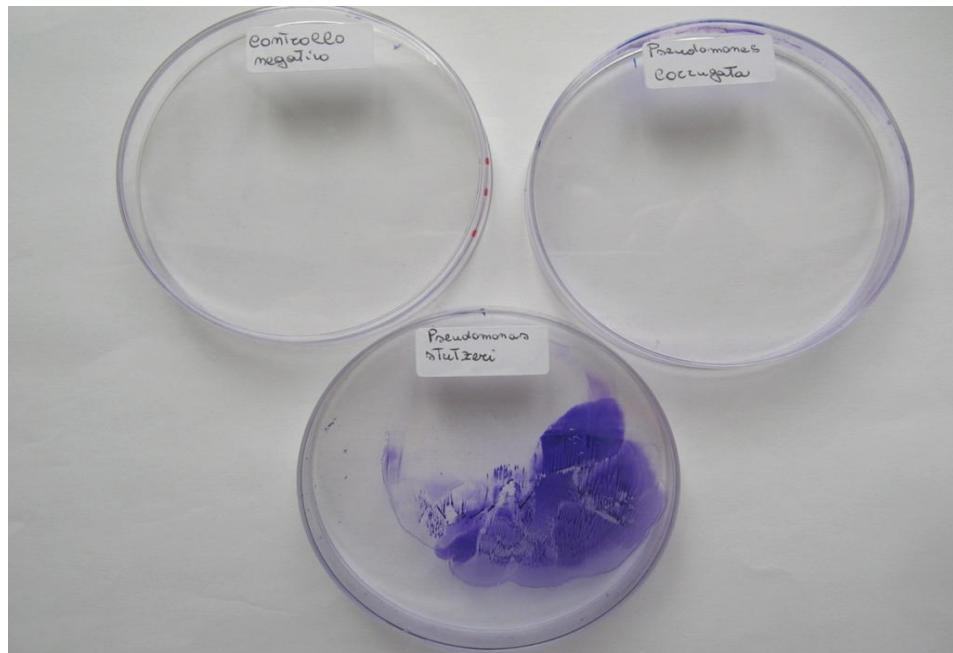


Fig. 3.23 Twitching motility in *P. stutzeri*

P. corrugata non si è dimostrato in grado di compiere questo particolare tipo di movimento pili dipendente; in questa specie, quindi, anche la capacità di acquisire DNA dall'esterno sarà probabilmente dovuto ad altri meccanismi indipendenti dal movimento twitching

4. DISCUSSIONE

Un gran numero di piante geneticamente modificate, soprattutto quelle di prima generazione, contengono geni di resistenza agli antibiotici che vengono utilizzati come geni marcatori nelle procedure di ottenimento delle piante transgeniche. Molti studi hanno dimostrato che con l'introduzione delle piante geneticamente modificate (PGM), eventi inattesi possono verificarsi a carico dei batteri "plant and soil associated" [Dunfield and Germida, 2004]. Il DNA vegetale, rilasciato durante la degradazione dei tessuti, può persistere e rimanere biologicamente attivo anche per anni suggerendo che nella fitosfera, cioè la rizosfera, le superfici aeree e i tessuti vegetali, i batteri presenti potrebbero venire a contatto con il DNA di piante GM e acquisire DNA esogeno. Tale fenomeno è noto con il nome di trasformazione naturale e sembra essere il principale meccanismo di trasferimento orizzontale di geni nei batteri.[Nielsen *et al.* 1997, Thomas and Nielsen 2005]. Prerequisiti per la trasformazione naturale sono: lo sviluppo di uno stato di competenza dei batteri, la disponibilità di DNA e l'integrazione stabile del DNA catturato nel genoma batterico. [Lorenz and Wackernagel, 1994, Gebhard and Smalla, 1999, Pontiroli *et al.*, 2009].

I dati riportati dalla letteratura scientifica indicano che almeno 90 specie batteriche, che rappresentano però solo il 2% delle specie procariotiche coltivabili, hanno mostrato lo sviluppo della competenza per un uptake attivo del DNA esogeno e tale lista è in continua espansione [de Vries and Wackernagel 2004]

In particolare, è stato evidenziato il trasferimento orizzontale del gene *nptII*, codificante per la neomicina fosfotransferasi II che determina la resistenza all'antibiotico kanamicina, da piante transgeniche verso alcune specie batteriche telluriche soprattutto appartenenti alle specie *Acinetobacter* sp. e *Pseudomonas stutzeri* [Gebhard and Smalla, 1999; de Vries *et al.* 2001]. Poche indagini, invece, sono state condotte per valutare il trasferimento di geni da piante a batteri fitopatogeni, i quali potrebbero rappresentare un target interessante in virtù del fatto che, durante il processo patogenetico le cellule vegetali vanno incontro a lisi rilasciando il DNA che potrebbe così essere disponibile ed essere acquisito da batteri competenti. Nonostante queste considerazioni gli studi dell'HGT verso i microrganismi fitopatogeni sono ancora molto pochi. [Schluter *et al.* 2005; Mercier *et al.* 2007; Demaneche *et al.* 2001].

In questo lavoro tre specie batteriche patogene per il pomodoro, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Ralstonia solanacearum*, *Pseudomonas corrugata*, sono state ottimizzate per verificare la possibilità di trasferimento orizzontale del gene *nptII* da piante di pomodoro geneticamente modificate a batteri fitopatogeni. Sono state scelte tre specie batteriche che avessero caratteristiche patogenetiche e di persistenza differenti fra loro. In particolare, *P. syringae* pv. *tomato* è un patogeno fogliare, poco competitivo e poco persistente nel suolo; *R. solanacearum*, è un ottimo competitore nel suolo e in grado di distruggere completamente la pianta in pochissimi giorni; *P. corrugata* è una specie polifaga, ubiquitaria e in grado di sopravvivere sia nelle piante infette che nel suolo anche senza l'ospite per molti mesi.

I batteri fitopatogeni trasformati con il plasmide pLAF Δ nptII, contenente il gene *nptII* deleto e non funzionante, sono stati definiti ceppi "accettori" e sono stati sottoposti a trasformazione in vitro con differenti fonti di DNA contenenti il gene *nptII*. I ceppi patogeni contenenti il gene Δ nptII, messi a contatto con il DNA del pomodoro GM contenente il gene *nptII*, in seguito all'acquisizione di DNA esogeno ed in seguito ad un evento di ricombinazione omologa potrebbero ripristinare il gene deleto e acquisire la resistenza all'antibiotico kanamicina.

Nessun trasformante di *R. solanacearum* kanamicina resistente è stato ottenuto; probabilmente questo batterio non raggiunge la necessaria competenza alla trasformazione nelle condizioni sperimentali testate. *P. syringae* pv. *tomato* mostra una frequenza di trasformazione estremamente bassa ($3 \times 10^{-9} \mu\text{g}^{-1}$) quando si usa come donatore DNA plasmidico mentre utilizzando DNA vegetale o tessuto vegetale omogenato non sono stati ottenuti trasformanti.

P. corrugata è stata invece trasformata con una frequenza di $9 \times 10^{-8} \mu\text{g}^{-1}$ utilizzando DNA plasmidico mentre quando è stato utilizzato DNA di pianta transgenica la frequenza di trasformazione è risultata talmente bassa da non poter essere calcolata.

Per tutte le tre specie, utilizzando come "ricevente" un ceppo batterico non ottimizzato e quindi privo della sequenza omologa a *nptII*, non si sono mai avuti trasformanti indicando quindi che la presenza dell'omologia di sequenza è indispensabile per la trasformazione, come già riportato in letteratura per le specie *Acinetobacter* sp. e *P. stutzeri*. [de Vries *et al.* 2001]

Dai primi dati ottenuti in vitro è risultato che *P. corrugata*, tra quelle saggiate è la specie che ha mostrato una maggiore attitudine all'acquisizione ed integrazione di DNA esogeno; è stata quindi scelta questa specie per effettuare una serie di esperimenti al fine di valutare

la possibilità di trasferimento genico orizzontale in diverse condizioni sia *in vitro* che *in vivo*.

La scelta di proseguire la sperimentazione con *P. corrugata* è stata anche dettata dal fatto che *P. corrugata* oltre ad essere una specie fitopatogena è anche una specie batterica in grado di sopravvivere per molti mesi sia nel terreno sia nelle piante infettate e la popolazione batterica durante tutto il periodo resta praticamente invariata. Questa lunga sopravvivenza unita al fatto che il DNA vegetale rilasciato durante la degradazione dei tessuti può persistere in uno "status" biologicamente attivo per un lungo periodo di tempo, anche fino a due anni [Widmer *et al.* 1997], la rende tra le tre specie sicuramente quella più a rischio di poter acquisire DNA esogeno.

Per gli esperimenti di trasformazione di *P. corrugata* si è scelto di utilizzare un ceppo con il gene $\Delta nptII$ integrato nel genoma piuttosto che presente in elementi plasmidici. Questa scelta ha consentito in primo luogo di evitare i problemi di perdita del plasmide in caso di crescita in assenza di selettivo e in secondo luogo ha permesso di verificare l'integrazione stabile di DNA esogeno nel cromosoma batterico e non in un elemento extracromosomiale che potrebbe essere presente in molteplici copie all'interno della cellula batterica. La frequenza di trasformazione *in vitro* di *P. corrugata* *chr::AnptII* è stata pari a circa $1.3 \times 10^{-8} \mu\text{g}^{-1}$ utilizzando come DNA "donatore" pGem*nptII*, leggermente inferiore a quella registrata con *P. corrugata* pLAF*AnptII*.

Quando è stato utilizzato come "donatore" il DNA del pomodoro transgenico BBS, sono state ottenute pochissime colonie trasformate e solo utilizzando quantità di DNA vegetale molto elevate (20-30 μg).

La frequenza di trasformazione è stata confrontata con quella dei batteri tellurici *Acinetobacter baileyi* e *Pseudomonas stutzeri*, che rappresentano le due specie modello, studiate già da molti anni riguardo al fenomeno del trasferimento genico orizzontale. [Carlson *et al.* 1983, Chamier *et al.* 1993, Gebhard and Smalla 1998, Sikorski *et al.* 2002]

Il numero di colonie trasformate è apparso molto più alto per le due specie telluriche, soprattutto per *A. baileyi* che ha mostrato una frequenza di trasformazione circa mille volte superiore a quella di *P. corrugata*. Le due specie telluriche confermano di avere una buona attitudine all'acquisizione di DNA esogeno, anche se presente a basse concentrazioni e anche se di origine vegetale [Gebhard and Smalla, 1998; de Vries *et al.* 2001 Iwaki and Arakawa, 2006].

P. corrugata chr::AnptII è stata trasformata in vitro anche utilizzando come “donatore” lisato cellulare di batteri contenenti il gene *nptII* ciò al fine di verificare che non fossero presenti in tali lisati sostanze che fungessero da barriere alla trasformazione naturale.

Sono stati utilizzati tre diversi lisati batterici: *P. corrugata*, *P. stutzeri*, *A. baileyi* tutti contenenti il gene *nptII* completo e funzionante. I lisati cellulari hanno rappresentato una efficace risorsa di DNA “donatore”; infatti la trasformazione di *P. corrugata chr::AnptII* con essi ha portato alla comparsa di un elevato numero di colonie trasformanti e l’efficienza di trasformazione di *P. corrugata* ottenuta in vitro con vari lisati cellulari è risultata superiore a quella ottenuta con il DNA plasmidico purificato.

I lisati cellulari di varie specie batteriche, nei quali il DNA può aderire a residui di polisaccaridi, proteine e residui di membrana, non inibiscono la trasformazione naturale di *P. corrugata*, anzi il DNA può trovarsi in condizione di essere maggiormente protetto da una rapida inattivazione e di essere quindi disponibile per essere acquisito dai batteri.

Una volta verificata la possibilità di *P. corrugata* di essere trasformata in vitro è stata considerata la possibilità che tale specie batterica possa essere trasformata in ambienti che simulano gli ambienti naturali. A tale scopo è stata studiata l’eventualità che *P. corrugata* possa essere trasformata in un microcosmo di suolo con diverse fonti di DNA “donatore”. Anche se *P. corrugata* si è dimostrata in grado di colonizzare bene il suolo, nessuna colonia di *P. corrugata* kanamicina resistente è stata ottenuta nelle condizioni testate; al contrario *Acinetobacter* sp. e *Pseudomonas stutzeri*, nonostante abbiano colonizzato meno efficacemente il suolo, sono state in grado di acquisire il DNA esogeno e integrarlo nel proprio genoma con una efficienza simile a quella rilevata nelle prove di trasformazione in piastra.

Molti ceppi di *P. corrugata* producono biofilm grazie ai quali riescono a colonizzare i tessuti vegetale e la rizosfera in maniera molto efficiente. [Catara 2007; Ude *et al.* 2006]. In alcune specie batteriche, quale ad esempio *Streptococcus mutans*, la produzione di biofilm è stata associata alla capacità di acquisire DNA esogeno mediante il meccanismo della trasformazione naturale [Li *et al.* 2000 and 2002]. In questo lavoro è stato sviluppato un protocollo che consente il monitoraggio simultaneo della densità batterica, del numero di trasformanti ottenuti e della quantità di biofilm prodotti in un periodo di trenta ore. Si può affermare che il ceppo di *P. corrugata chr::AnptII*, coltivato in condizioni tali da favorire la produzione di biofilm, non è stato trasformato dal DNA di pGem*nptII* in quanto non sono state rinvenute colonie kanamicina resistenti durante tutte le 30 ore di svolgimento dei saggi.

Le ultime prove di trasformazione sono state effettuate in vivo inoculando direttamente i patogeni *P. corrugata* chr::AnptII e *P. corrugata* pLAFAnptII nelle piante di pomodoro transgeniche BBS. L'ipotesi formulata è che le cellule batteriche possano sviluppare, naturalmente, uno stato di competenza e acquisire ed integrare il DNA esogeno rilasciato dalle cellule vegetali danneggiate dal patogeno. Le piantine di pomodoro inoculate con *P. corrugata*, sono state monitorate per un periodo di circa cinque mesi, durante i quali periodicamente è stata verificata la comparsa di individui resistenti alla kanamicina. Anche in questo caso però il batterio non ha ripristinato la funzionalità del gene *AnptII*, indicando che non sono avvenuti fenomeni di ricombinazione omologa tra il DNA batterico e quello vegetale.

In conclusione, per la prima volta è stato dimostrato che *P. corrugata* è una specie batterica in grado, in condizioni ottimizzate di laboratorio, di catturare ed integrare DNA esogeno nel proprio genoma mediante trasformazione naturale; questo avviene però solo se sono presenti sequenze omologhe nel “ricevente “ e nel DNA “donatore”; infatti nessun ricombinante kanamicina resistente è stato ottenuto utilizzando come “donatore” DNA privo della sequenza *nptII* oppure utilizzando come ricevente un ceppo di *P. corrugata* privo della sequenza omologa a *nptII*. Il meccanismo messo in atto *P. corrugata* per l'uptake del DNA esogeno è ancora tutto da investigare, infatti tale meccanismo sicuramente è differente ad esempio da quello attuato da *P. stutzeri*, nel quale la capacità di acquisire DNA esogeno è correlata all'espressione del gene *pilT* ed alla capacità del batterio di compiere il movimento pili-dipendente del twitching.

La frequenza di trasformazione di *P. corrugata* è risultata essere molto più bassa rispetto alle due specie batteriche modello *Acinetobacter* sp. e *P. stutzeri* ed è inoltre richiesta una maggior quantità di DNA disponibile per l'uptake. Anche se la possibilità di trasferimento genico orizzontale è stata dedotta in questo lavoro, così come in molti altri descritti nella letteratura scientifica, dalla frequenza di trasformazione osservata in condizioni ottimizzate di laboratorio; appare chiaro che la valutazione della frequenza di trasformazione non tiene adeguatamente in considerazione i fattori ambientali, le dinamiche di popolazione, la disponibilità di nutrienti, ecc. [Thomas and Nielsen 2005]

Per questo motivo la frequenza di trasformazione in natura potrebbe risultare ancora più bassa rispetto a quella determinata in laboratorio, così come al contrario, in natura potrebbero esserci condizioni ambientali maggiormente favorevoli alla trasformazione naturale, che attualmente non si conoscono e che non si è in grado di riprodurre in laboratorio. E' questo il caso di *Pseudomonas fluorescens* e di *Agrobacterium tumefaciens*,

che sono state considerate due specie non trasformabili dal momento che diversi esperimenti in vitro hanno dato esito negativo. Queste due specie successivamente sono però risultate trasformabili da DNA esogeno di varia natura in un suolo naturale. [Demanèche *et al.* 2001]

Quelle riferite in questo lavoro di tesi rappresentano alcune delle prime prove in assoluto di possibile interazione in vivo tra specie batterica patogena e PGM. Da questo studio si evince che *P. corrugata* è una specie sicuramente in grado di mettere in atto meccanismi per catturare ed integrare nel proprio genoma DNA esogeno di varia natura, ma nelle condizioni *in vivo* che sono state saggiate non si sono venute a creare le condizioni affinché i batteri potessero sviluppare la necessaria competenza per la trasformazione naturale. I nostri dati concordano con quanto già riportato nella letteratura scientifica riguardante la problematica esposta in questa tesi. Schluëter *et al.* (1995), hanno infatti concluso, dai loro esperimenti sull'interazione tra patata transgenica ed *Erwinia chrysanthemi*, che il trasferimento genico orizzontale da piante GM e batteri fitopatogeni è un evento molto improbabile. Mercier *et al.* (2007) hanno invece concluso che la specie *Ralstonia solanacearum* non è geneticamente trasformabile da DNA di piante transgeniche in nessuna delle molteplici condizioni in vivo ed in vitro che hanno testato.

Delle evidenze riportate nella recente letteratura scientifica e alla luce dei dati esposti nella presente tesi, si può concludere che il trasferimento genico orizzontale tra piante GM e batteri fitopatogeni sembra essere un evento estremamente raro in natura.

5. BIBLIOGRAFIA

Bais H.P., Weir T.L., Perry L.G., Gilory S. and Vivanco J.M., **2006** “The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms” *Annual Review of Plant Biology* 57: 233-266

Bella P., Greco S., Polizzi G., Cirvilleri G. and Catara V., **2003** “Soil fitness and thermal sensitivity of *P.corugata* strains” *Acta Horti (ISHS)* 614: 831-836

Bennet P.M., Livesey C.T., Nathwani D., Reeves D.S., Saunders J.R. and Wise R., **2004** “An assessment of the risks associated with the use of antibiotic resistance genes in genetically modified plants: report of the Working Party of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy” *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 53: 418-431

Bertolla F., Frostegaard A., Brito B., Nesme X. and Simonet P., **1999** “During infection of its hosts, the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* naturally develops a state of competence and exchanges genetic material” *Mol.Plant Mic.Interac.* 12: 467-472

Bertolla F., Simonet P. **1999^b** “Horizontal gene transfers in the environment: natural transformation as a putative process for gene transfers between transgenic plants and microorganisms” *Research in microbiology* 150(6): 375-384

Bertolla F., Van Cijsegem F., Nesme X. and Simonet P., **1997** “Conditions for natural transformation of *Ralstonia solanacearum*” *Appl.Environ.Microbiol.* 63: 4965-4968

Buddenhagen I.W., Sequeira L. and Kelman A. **1962** “Designation of races of *Pseudomonas solanacearum*” *Phytopathology* 52: 726

Carlson C.A., Pierson L.S., Rosen J.J. and Ingraham J.L., **1983** “*Pseudomonas stutzeri* and related species undergo natural transformation” *Journal of Bacteriology* 153: 93-99

- Catara V., **2007** “*Pseudomonas corrugata* : plant pathogen and/or biological resource?” Mol.Plant Pathol. 8: 233-244
- Chamier B., Lorenz M.G. and Wackernagel W., **1993** “Natural transformation of *Acinetobacter calcoaceticus* by plasmid DNA adsorbed on sand and groundwater aquifer material” Appl.Environ.Microbiol. 59: 1662-1667
- Chapman M.R and Kao C.C., **1997** “EpsR modulates production of extracellular polysaccharides in the bacterial wilt pathogen *Ralstonia* (*Pseudomonas*) *solanacearum*” Journal of Bacteriology 180(1): 27-34
- Chung C.T., Niemela S.L. and Miller R.H. **1989** “One-step preparation of competent *Escherichia coli*: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution” PNAS 86:2172-2175
- Clive J., **2008** Global status of commercialized biotech/GM crops: ISAA Brief N.39. ISAA: Ithaca, NY
- Coco V, Catarat V., Spedini R. and Cirvilleri G., **2001** “SEM observation of tomato stems infected with *P.corugata*” Proceedings 5th Congress of the European Foundation for Plant Pathology. 534-538
- Coupat B., Chaumeille-Dole F., Fall S., Prior P., Simonet P., Nesme X. and Bertolla F., **2007** “Natural transformation in the *Ralstonia solanacearum* species complex: number and size of DNA that can be transferred” FEMS Microbiology Ecology 66(1): 14-24
- De Lorenzo V., Herrero M., Jakubzik U. and Timmis K.N., **1990** “Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in Gram-Negative Eubacteria” Journal of Bacteriology 172(11): 6568-6572
- de Vries J. and Wackernagel W., **2004** “Microbial horizontal gene transfer and the DNA release from transgenic crop plants” Plant and Soil 266: 91-104
- de Vries J., and Wackernagel W., **1998** “Detection of *nptII* (kanamycin resistance) genes in genomes of transgenic plants by marker rescue transformation” Mol.Gen.Genet. 257:606-613

de Vries J., Meier P. and Wackernagel W., **2001**. "The natural transformation of the soil bacteria *Pseudomonas stutzeri* and *Acinetobacter* sp. by transgenic plant DNA strictly depends on homologous sequences in the recipient cells." FEMS Microbiol. Lett. 195: 211-215

Demanèche S., Kay E., Gourbière F., Simonet P. **2001** "Natural transformation of *Pseudomonas fluorescens* and *Agrobacterium tumefaciens* in soil" Applied and Environmental Microbiology 67(6): 2617-2621

Demanèche S., Sanguin H., Poté J., Navarro E., Bernillon D., Mavingui P., Wildi W., Vogel T.M. and Simonet P., **2008** "Antibiotic- resistant soil in bacteria in transgenic plant fields" PNAS 105(10): 3957-3962

Dunfield K.E. and Germida J.J. **2004** "Impact of genetically modified crops on soil and - plant-associated microbial communities" Journal of Environmental Quality 33: 806-815

Gebhard F. and Smalla K. **1998** "Transformation of *Acinetobacter* sp. strain BD413 by transgenic sugar beet DNA" Appl. Environ. Microbiol. 64, 1550-1554.

Gebhard F. and Smalla K. **1999** "Monitoring field releases of genetically modified sugar beets for persistence of transgenic plant DNA and horizontal gene transfer" FEMS Microbiol. Ecol. 28:261-271

Goldstein D.A., Tinland B., Gilbertson L.A., Staub J.M., Bannon G.A., Goodman R.E., McCoy R.L. and Silvanovich A., **2005** "Human safety and genetically modified plants: areview of antibiotic resistance markers and future transformation selection technologies" Journal of Applied Microbiology 99: 7-23

Graupner S., Weger N., Sohni M. and Wackernagel W. **2001** " Requirement of novel competence genes *pilT* and *pilU* of *Pseudomonas stutzeri* for natural transformation and suppression of *pilT* deficiency by hexahistidine tag on the type IV pilus protein PilA1" Journal of Bacteriology 183(16): 4694-4701

Grayston S.J., Wang S., Campbell C. D. and Edwards A. C. **1998** "Selective influence of plant transcripts". Science 263: 1423-1425

Greco S., Bella P., Polizzi G., Cirvilleri G. and Catara V., **2002** “Sopravvivenza nel terreno di pseudomonadi responsabili della necrosi del midollo del pomodoro” Atti del IX° Convegno Nazionale SIPaV, Roma 1-2 ottobre 2002

Guo Y., Zheng H., Yang Y. and Wang H., **2007** “Characterization of *Pseudomonas corrugata* strain P94 isolated from soil in Beijing as a potential biocontrol agent” Curr.Microbiol. 55: 247-253

Hamon M A. and Lazazzera B.A., **2001** “The sporulation transcription factor Spo0A is required for biofilm development in *Bacillus subtilis*” Molecular Microbiology 42(5): 1199–1209

Hopkins D.W. and Gregorich E.G., **2004** “Decomposition of transgenic (Bt) maize (*Zea mais* L.) residues in soil” Proceedings of Eurosoil 2004, Freiburg (Germany), 4-12 September

Iacobellis N.S. and Lo Cantore P., **2007** “Le malattie batteriche delle solanacee: aspetti eziologici, epidemiologici, di diagnosi e misure di lotta” Informatore fitopatologico-Speciale Difesa Solanacee 6: 8-18

Iwaki, M. and Arakawa Y. **2006** “Transformation of *Acinetobacter* sp. BD413 with DNA from commercially available genetically modified potato and papaya” Letters in Applied Microbiology 43: 215-221

Kay E^a., Vogel T.M., Bertolla F., Nalin R. and Simonet P., **2002** “In situ transfer of antibiotic resistance genes from transgenic (transplastomic) tobacco plants to bacteria” Applied and Envir.Microb. 68: 3345-3351

Kay^b E., Bertolla F., Vogel T.M and Simonet P., **2002** “Opportunistic colonization of *Ralstonia solanacearum*-infected plants by *Acinetobacter* sp and its natural competence development” Microbial Ecology 43: 291-297

Keese P. **2008** “Risks from GMOs due to horizontal gene transfer” Environ.Biosafety Res. 7: 123-149

Kelly B.G., Vespermann A. and Bolton D.J., **2009** “Gene transfer events and their occurrence in selected environments” Food and chemical Toxicology 47: 978-983

- Li Y.H., Lau P.C.Y., Lee J.H. Ellen R.P. and Cvitkovitch D.G., **2001** “Natural genetic transformation of *Streptococcus mutans* growing in biofilms” Journal of Bacteriology 183(3): 897-908
- Li Y.H., Tang N., Aspiras M.B., Lau P.C.Y., Lee J.H. Ellen R.P. and Cvitkovitch D.G., **2002** “A quorum sensing signaling system essential for genetic competence in *Streptococcus mutans* is involved in biofilm formation” Journal of Bacteriology 184(10): 2699-2708
- Licciardello G., Bertani I., Steindler L., Bella P., Venturi V. and Catara V., **2007** “*Pseudomonas corrugata* contains a conserved N-acyl homoserine lactone quorum sensing systems; its role in tomato pathogenicity and tobacco hypersensitivity response” FEMS Microb.Ecol. 61(2): 222-234
- Lorenz M.G. and Wackernagel W. **1994** “Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment” Microbiol. Rev. 58, 563-602
- Lorenz M.G., and Sikorski J., **2000** “ The potential for intraspecific horizontal gene exchange by natural genetic transformation: sexual isolation among genomovars of *Pseudomonas stutzeri*” Microbiology 146:3081-3090
- Louws F.J., Wilson M., Campbell H.L., Cuppels D.A., Jones J.B., Shoemaker P.B., Shain F. and Miller S.A., **2001** “Field control of bacterial spot and bacterial speck of tomato using plant activator” Plant Disease 85: 481-488
- Martinez J.L. **2008** “Antibiotics and antibiotic resistance genes in natural environments” Science 321(5887): 365-367
- Matta A., **1996** Fondamenti di Patologia Vegetale. Patron Editore: 230-252
- McGurl B., Orozco-Cardenas M., Pearce G., and Ryan C.A. **1994** “Overexpression of the prosystemin gene in transgenic tomato plants generates a systemic signal that constitutively induces proteinase inhibitor synthesis” PNAS. 91: 9799-9802.
- Mercier A., Bertolla F., Passelegue-Robe E. and Simonet P., **2007** “Natural transformation based foreign DNA acquisition in a *R. solanacearum mutS* mutant” Research in Microbiology 158(6): 537-544

Miller R. **1998** “Scambio di geni in natura” Le scienze 335 69-73

Nielsen K.M., Bones A.M., Smalla K. and van Elsas J.D. **1998** “Horizontal gene transfer from transgenic plants to terrestrial bacteria – a rare event?” FEMS Microbiol. Rev. 22:79-103

Nielsen^a K.M., Gebhard F., Smalla K., Bones A.M. and van Elsas, J.D. **1997** “Evaluation of possible horizontal gene transfer from transgenic plants to the soil bacterium *Acinetobacter calcoaceticus* BD413”. Theor. Appl. Genet. 95: 815-821

Nielsen^b K.M., van Weerlet M., Berg T.N., Bones A.M., Hagler A.N. and van Elsas J.D., **1997** “Natural transformation and availability of transforming DNA to *Acinetobacter calcoaceticus* in soil microcosmos” Appl. Environ. Microbiol. 63: 1945-1952

Nordlee J.A., Taylor S.L., Townsend J.A., Thomas L.A. and Bush R.K., **1996** “Identification of a Brazil-nut allergen in transgenic soybeans” New England Journal of Medicine 334 (11): 688-92

O'Toole G.A., Pratt L.A., Watnick P.I., Newman D.K., Weaver V.B. and Kolter R., **1999** “Genetic approaches to study of biofilms” Methods Enzymol 310: 91–109

Pontiroli A., Rizzi A., Simonet P., Daffonchio D., Vogel T.M. and Monier J.M., **2009**. “Visual evidence of horizontal gene transfer between plants and bacteria in the phytosphere of transplastomic tobacco”. Appl. Environ. Microbiol. 75(10):3314-22

Potè J., Ceccherini M.T., Van T.V., Rosselli W., Wildi W., Simonet P. and Vogel T.V. **2003** “ Fate and transport of antibiotic resistance genes in saturated soil columns” Soil Biology 39: 65-71

Ray J.L. and Nielsen K.M., **2005** “Experimental methods for assaying natural transformation and inferring horizontal gene transfer” Methods in Enzymology 395: 491-520

Riesenfeld C.S., Goodman R.M. and Handelsman J., **2004** “Uncultured soil bacteria are a reservoir of new antibiotic resistance genes” Envir. Microb. 6(9): 981-989

Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T **1989**. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed.,p.Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York

Saxena D. and Stotzky G. **2000** "Insecticidal toxin from *Bacillus thuringiensis* is released from roots transgenic Bt corn in vitro and in situ" FEMS Microb.Ecology 33: 35-39

Scarlett C.M., Fletcher J.T., Roberts P. and Lelliot R.A., **1978** "Tomato pith necrosis caused by *Pseudomonas corrugata* n.sp." Ann.Appl.Biol. 88: 105-114

Schell M.A., **2000** "Control of virulence and pathogenicity genes of *Ralstonia solanacearum* by an elaborate sensory network" Annual Review of Phytopathology 38: 263-292

Schluëter K., Futterer J. and Potrykus I. **1995** "Horizontal gene transfer from a transgenic potato line to a bacterial pathogen (*Erwinia chrysanthemi*) occurs-if at all-at an extremely low frequency" Nature Biotechnology 13: 1094-1098

Scortichini M., **1989** "Occurrence in soil and primary infections of *P. corrugata* Roberts and Scarlett" J. Phytopathol. 125: 33-40

Scortichini M., **1995** Le Malattie batteriche delle colture agrarie e delle specie forestali. Edagricole p.331-332

Sikorski J., Teschner N. and Wackernagel W. **2002** "Highly different levels of natural transformation are associated with genomic sub-groups within a local population of *Pseudomonas stutzeri* from soil" Appl.Environ.Microbiol. 68: 865-873

Smalla K., Borin S., Heuer H., Gebhard F., Van Elsas J.D. and Nielsen K., **2000** "Horizontal transfer of antibiotic resistance genes from transgenic plants to bacteria- Are there new data to fuel the debate?" Proceedings of the 6th International Symposium on the Biosafety of GMOs, Saskatoon, Canada, pag. 146-154

Smalla K., van Overbeek L.S., Pukall R. and van Elsas J.D., **1993** "Prevalence of *nptII* and Tn5 in kanamycin-resistant bacteria from different environments" FEMS Microb.Ecol. 13(1): 47-58

Staskawowicz B., Dahlbreck D., Keen N., and Napoli C. **1987** "Molecular characterization of cloned avirulence genes from race 0 and race 1 of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*" Journal of Bacteriology. 169:5789-5794

Suarez A., Guttler A., Stratz M., Staendner L.H., Timmis K.N. and Guzman C.A., **1997** “Green fluorescent protein-based reporter systems for genetic analysis of bacteria including monocopy applications” *Gene* 196: 69-74

Suslow T.V., Schroth M.N. and Isake M., **1982** “Application of a rapid method for Gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining” *The American Phytopathological Society*, 72:356-358

Thomas C.M. and Nielsen K.M., **2005** “Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria” *Nature Reviews Microbiology* 3: 711-721

Tormo M., Knecht E., Gotz F., Lasa I. and Penades J.R., **2005** “Bap-dependent biofilm formation by pathogenic species of *Staphylococcus* : evidence of horizontal gene transfer?” *Microbiology* 151 (7): 2465-2475

Ude S., Arnold D.L., Moon C.D., Timms Wilson T. and Spiers A.J., **2006** “Biofilm formation and cellulose expression among different environmental *Pseudomonas* isolates” *Environ.Microbiol.* 8: 1997-2011

Veena M.S. and van Vuurde J.W.L., **2002** “ Indirect immunofluorescence colony staining method for detecting bacterial pathogens of tomato” *Journal of Microb. Methods* 49:11-17

Watson S.K., Carter P.E., **2008** “Environmental influences on *Acinetobacter* sp. strain BD413 transformation in soil” *Biol.Fertil.Soils* 45: 83-92

Widmer F., Seidler R. J., Donegan K.K. and Reed G.L., **1997** “ Quantification of transgenic plant marker gene persistence in the field” *Molecular Ecology* 5: 6-17

Widmer F., Seidler R.J. and Watrud L.S., **1996** “Sensitive detection of transgenic plant marker gene persistence in soil microcosmos” *Molecular Ecology* 5: 603-613

Wilson M., Campbell H.L., Ji P., Jones J.B. and Cuppels D.A., **2002** “Biological control of bacterial speck of tomato under field conditions at several locations in North America” *Phytopathology* 92: 1284-1292

www.cbd.int

www.conservationmeasures.org

www.efsa.europa.eu

www.eppo.org

www.ncbi.nlm.nih.gov

www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/

Yabuuchi E., Kawamura Y., Yano I., Hotta H. and Nishiuchi Y., **1995** “Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen.nov.: proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) comb.nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb.nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb.nov.” Microbiol. Immunol. 39: 897-904

Zaccardelli M., Spasiano A., Bazzi C. and Merighi M., **2005** “Identification and in planta detection of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* using PCR amplification of *hrpZ_{Pst}*” European Journal of Plant Pathology 111: 85-90